

**Tyvifukosyloitujen glykopeptidien tandem-massaspektrin
tulkinta ja glykoproteiinien identifiointi *in silico*
Glycopeptide ID -ohjelman avulla**

Pro gradu –tutkielma

24.08.2012

Hilkka Kontro

Helsingin yliopisto

Bio- ja ympäristötieteellinen tiedekunta

Biotieteiden laitos

ALKUSANAT

Tämän Pro gradu -työn kokeellinen osuus tehtiin helmi-kesäkuussa 2012 Helsingin yliopiston lääketieteellisessä tiedekunnassa Haartman-instituutissa professori Risto Renkosen ryhmässä. Haluan lämpimästi kiittää Ristoa ja käytännön ohjaajaani Sakari Joenväärää hyvästä opastuksesta glykoproteiinien massaspektrometrian maailmaan, kuten myös tohtorikoulutettavia Ville Parviaista ja Niina Tohmolaa sekä koko muuta ryhmää korvaamattomasta avusta laitteiden käytön ja menetelmien opettelussa.

Kiittäisin myös ystäviäni, vanhempiani ja sisaruksiani tuesta ja kiinnostuksesta pro gradu –työtäni kohtaan, sekä tuoretta aviomiestäni Pasia rohkaisusta ja ymmärryksestä epävarmoina hetkinä.

Hilkka Kontro

TIIVISTELMÄ

Tiedekunta – Fakultet – Faculty Bio- ja ympäristötieteellinen tiedekunta		Laitos – Institution – Department Biotieteiden laitos	
Tekijä – Författare – Author Hilkka Kontro			
Työn nimi – Arbetets titel – Title Tyvifukosyloitujen N-glykopeptidien tandem-massaspektrin tulkinta ja glykoproteiinien identifiointi <i>in silico</i> Glycopeptide ID –ohjelman avulla			
Oppiaine – Läroämne – Subject Biokemia			
Työn laji – Arbetets art – Level Pro gradu -tutkielma	Aika – Datum – Month and year 08/2012	Sivumäärä – Sidoantal – Number of pages 72	
Tiivistelmä – Referat – Abstract			
<p>N-glykoproteiinien tyvirakenteen fukosylaatio on yhteydessä erilaisiin syöpiin ja muihin patologisiin tiloihin. Glykoproteiinien identifiointi ja niiden glykaanirakenteen määrittäminen massaspektrometrian (MS) avulla on manuaalisesti aikaavievää ja työlästä.</p> <p>Tässä Pro gradu -työssä selvitettiin, soveltuuko Glycopeptide ID –massaspektrin-tulkintaohjelma tyvifukosylaation tunnistamiseen tunnetusta tyvifukosyloidusta malliaineesta, immunoglobuliini G:stä, sekä tuntemattomia glykoproteiineja sisältävästä plasmanäytteestä. MS-analyysiä varten proteiinit digestoitiin trypsiinillä ja glykopeptidit rikastettiin lektiini-affiniteetti-kromatografialla. Malliaine- ja plasmanäytteistä valmistettiin myös α-L-fukosidaasilla käsitellyt näytteet tyvifukoosin poistamiseksi.</p> <p>Glykopeptidien esiintyminen selvitettiin korkean erotuskyvyn nestekromatografia-massaspektrometria (HPLC-MS) -analyysissä ja ne fragmentoitiin törmäys-indusoidulla dissosiaatiolla (CID) tandem-MS (MS/MS) -analyysissä. MS/MS-spektrit analysoitiin <i>in silico</i> Glycopeptide ID –ohjelmalla. Ohjelman havaittiin tunnistavan tyvifukosylaation luotettavasti laadukkaista spektreistä, mutta proteiinien identifiointi oli usein puutteellista heikkolaatuisemmista spektreistä. Tuntemattomien proteiinien plasmanäytteestä löydettiin todennäköinen tyvifukosylaatio IgG2:lta, fetuiini A:lta, serotransferriiniltä, hemopeksiiniltä ja seruloplasmiinilta.</p> <p>Johtopäätöksenä todettiin Glycopeptide ID –ohjelman olevan käyttökelpoinen väline N-glykopeptidien tyvifukosylaation tunnistamiseen.</p>			
Avainsanat – Nyckelord – Keywords glykoproteiini, massaspektrometria, fukosylaatio, <i>in silico</i> -analyysi			
Ohjaaja tai ohjaajat – Handledare – Supervisor or supervisors Risto Renkonen ja Sakari Joenväärä			
Säilytyspaikka – Förvaringställe – Where deposited Helsingin yliopisto, Viikin tiedekirjasto			
Muita tietoja – Övriga uppgifter – Additional information			

ABSTRACT

Tiedekunta – Fakultet – Faculty Faculty of Biological and Environmental Sciences		Laitos – Institution – Department Department of Biosciences
Tekijä – Författare – Author Hilkka Kontro		
Työn nimi – Arbetets titel – Title Interpretation of tandem mass spectra of core-fucosylated N-glycopeptides and identification of glycoproteins <i>in silico</i> by using the spectrum-analyzing software Glycopeptide ID		
Oppiaine – Läroämne – Subject Biochemistry		
Työn laji – Arbetets art – Level Pro gradu thesis	Aika – Datum – Month and year 08/2012	Sivumäärä – Sidoantal – Number of pages 72
Tiivistelmä – Referat – Abstract		
<p>Core-fucosylation of N-glycoproteins is associated with different cancers and other pathologies. Identification of glycoproteins and determination of their glycan structure manually by mass spectrometry (MS) is time-consuming and laborious.</p> <p>In this Pro gradu thesis, the use of the mass spectrum-analyzing software Glycopeptide ID for identification of core-fucosylation from a known standard, immunoglobulin G, was studied. Also, a plasma sample with unknown glycoproteins was analyzed. For the MS analysis, the proteins were digested with trypsin, and the resulting glycopeptides were enriched using lectin affinity chromatography. From IgG and plasma, also samples treated with α-L-fucosidase were prepared in order to cleave the core fucose.</p> <p>The presence of glycopeptides was determined by high-performance liquid chromatography-mass spectrometry (HPLC-MS) analysis, and they were fragmented using collision-induced dissociation (CID) in a tandem-MS (MS/MS) analysis. The MS/MS spectra were analyzed with the Glycopeptide ID software. The software was found to identify core-fucosylation reliably from high-quality spectra, but identification of proteins were often incomplete from spectra with poor quality. From the plasma sample with unknown proteins, a probable core-fucosylation was found from IgG2, fetuin A, serotransferrin, hemopexin and ceruloplasmin.</p> <p>As a conclusion, the software Glycopeptide ID can be considered as an appropriate tool for identification of core-fucosylation in N-glycopeptides.</p>		
Avainsanat – Nyckelord – Keywords glycoprotein, mass spectrometry, fucosylation, <i>in silico</i> analysis		
Ohjaaja tai ohjaajat –Handledare – Supervisor or supervisors Risto Renkonen and Sakari Joenväärä		
Säilytyspaikka – Förvaringställe – Where deposited University of Helsinki, Viikki Campus Library		
Muita tietoja – Övriga uppgifter – Additional information		

SISÄLLYSLUETTELO

ALKUSANAT	1
TIIVISTELMÄ	2
SISÄLLYSLUETTELO	4
LYHENTEET	6
1. JOHDANTO	8
1.1. Glykoproteiinit ja niiden luokittelu	9
1.1.1 N-glykaanien rakenteet ja biosynteesi.....	9
1.1.2 N-glykaanien esiintyminen ja tehtävät.....	12
1.2. Proteiinien N-glykosylaation kliiniset merkitykset	13
1.2.1. N-glykosylaation muutokset syövässä	13
1.2.2. N-tyvifukosylaatio muissa patologisissa tiloissa	15
1.3. Lyhyesti glykoproteiinianalytiikasta	15
1.4. Massaspektrometria glykoproteiinianalytiikassa	16
1.4.1. Historiaa	16
1.4.2. Glykopeptidien detektointi näytteestä.....	16
1.4.3. Glykopeptidien fragmentointi ja MS/MS-spektrin analyysi	17
1.4.4. Massa-analysaattorit.....	22
1.4.5. MS-näytteensyöttömenetelmät	23
1.4.6. Glykoproteiinien rikastus	24
2. TUTKIMUKSEN TARKOITUS.....	25
3. MATERIAALIT JA MENETELMÄT	25
3.1. Reagenssit ja materiaalit.....	25
3.2. Laitteisto	25
3.2.1. Nestekromatografia	25
3.2.2. Massaspektrometria.....	26
3.2.3. Ohjelmisto	27
3.3. Näytteiden esikäsittely	27
3.3.1. Plasman esikäsittely	27
3.3.2. IgG-malliaineen esikäsittely	30
3.3.3. Fukosidaasikäsittelyt	31
3.4. <i>In silico</i> -työvaiheet	31

3.4.1. Spektrinkäsittely	31
3.4.2. Analyysi Glycopeptide ID –ohjelmalla	33
4. TULOKSET	36
4.1. Malliaineen ja defukosyloidun malliaineen analyysi	36
4.2. Plasmanäytteestä identifioitunut tyvifukosyloidut glykopeptidit	42
5. TULOSTEN TARKASTELU.....	51
6. JOHTOPÄÄTÖKSET	55
7. VIITTEET	57
8. LIITTEET	65
Liite 1. LC-parametrit.	65
Liite 2. MS-parametrit.....	66

LYHENTEET

ACN: asetonitrili

CID: törmäys-indusoitu dissosiaatio (*engl.* collision induced dissociation)

ECD: elektroninkaappausdissosiaatio (*engl.* electron capture dissociation)

ETD: elektroninsiirtodissosiaatio (*engl.* electron transfer dissociation)

ESI: sähkösumutusionisaatio (*engl.* electrospray ionization)

DDT: diklooridifenyylikloorietaani

HPLC: korkean erotuskyvyn nestekromatografia (*engl.* high performance liquid chromatography)

MALDI: matriisiavusteinen laserdesorptio/ionisaatio (*engl.* matrix-assisted laser desorption/ionization)

MS: massaspektrometria

MS/MS : massaspektrometria-massaspektrometria, tandem-massaspektrometria

PBS: fosfaattipuskuroitu saliiini (*engl.* phosphate buffered saline)

Q-TOF-MS: kvadrupoli-lentoaikamassaspektrometri (*engl.* quadrupole time-of-flight)

SDS-PAGE: natriumdodekyylisulfaatti-polyakryyliamidigeelielektroforeesi (*engl.* sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electroforesis)

1. JOHDANTO

Ihmisen plasma on diagnostiikassa ja hoitoseurannassa avainasemassa merkkiaineiden lähteenä, mutta lukemattomalle määrälle potentiaalisia biomarkkereita puuttuu vielä kliiniseen analytiikkaan soveltuva menetelmä. Proteomiikan tieteenalan synty on lisännyt proteiinien merkitystä merkkiaineina, mutta rutiinianalytiikassa niitä käytetään kuitenkin yhä suhteellisen vähän. Kaikista proteiineista yli puolen arvioidaan olevan glykosyloituja,² ja glykoproteomiikka on ollut viime vuosikymmenillä enenevässä määrin tutkimuksen kohteena.^{3,4}

Translaation jälkeisistä proteiinimodifikaatioista glykosylaatio on fosforylaation ohella yleisimpiä ja kenties monimutkaisimpia. Sillä on merkitystä solujen keskenäisissä sekä solun ja matriisin välisissä vuorovaikutuksissa, proteiinin laskostumisessa ja sen funktion säätelyssä, solujen ja proteiinien eliniän säätelyssä, proteiinien kohdentamisessa sekä mikro-organismien tarttumisessa.^{5,6} Hiilihydraattiketjun sekvenssiä ei ole koodattu DNA:n emäsjärjestykseen, jolloin sen ennustaminen suoraan sitä kantavan proteiinin aminohapposekvenssin tapaan ei ole mahdollista. Sen sijaan tietyn glykaanirakenteen synteesiin vaikuttavat useat hiilihydraattiaineenvaihdunnan entsyymit.^{7,8} Nämä entsyymit käsittävät nisäkkäillä jopa 1-2 % genomista; glykosylaatiokoneiston ylläpito on selvästi ollut evoluutiossa kannattava investointi. Selkärangaisilla ja erityisesti nisäkkäillä on monimutkainen kokoelma glykaaneja, ja se eroaa rakenteellisesti selkärangattomien, alempien eukaryoottien ja prokaryoottien glykomista. Tästä syystä näyttää ilmeiseltä, että glykaaneilla on tehtävä toimia molekulaarisena perustana lajienvälisessä tunnistuksessa.⁹

Koska tietyn proteiinin glykosylaatiomalli ei ole ennalta määrätty genomissa, riippuu sen lopullinen ulkoasu solu ympäristöstä, jossa se syntetisoidaan. Sama polypeptidiketju voidaan glykosyloidia eri tavoin erilaisissa soluissa ja kudoksissa, mikä tarjoaa mahdollisuuden tunnistaa epänormaaleja kudoksia muuntuneiden glykosylaatiokohtien avulla. Muutokset glykosylaatiossa syöpäkasvaimissa on tunnettu jo useita vuosikymmeniä.¹⁰

Polypeptidirakenteeseen kovalenttisesti kiinnittyneet hiilihydraattiketjut lisäävät saman proteiinin luontaisia esiintymismuotoja esiintymällä erilaisina versioina, glykomuotoina eli glykovariantteina (*engl.* glycoform, glycovariant).¹¹ Saman N-

glykosylaatiokohdan (*engl.* N-glycosylation site) varianssia kutsutaan mikroheterogeenisyydeksi. Kun proteiinissa on vain yksi N-glykosylaatiokohta, on glykoproteiinivarianttien määrä sama kuin erilaisten oligosakkaridien määrä. Jos samassa proteiinissa on useita N-glykosylaatiokohtia, nousee glykovarianttien määrä jo huomattavasti suuremmaksi. Eri glykovarianttien pienten erojen osoittaututtua kliinisesti merkittäviksi on uusille, tehokkaille analyysimenetelmille syntynyt kysyntää, johon automatisoidut analyysimetodit voivat vastata.

1.1. Glykoproteiinit ja niiden luokittelu

Glykaani voi liittyä pääsääntöisesti kahdella eri sidoksella peptidirunkoon. O-glykaani muodostuu glykosididoksella hiilihydraattiketjun liittyessä seriini-, treoniini-, tyrosiini-, hydroksiprolini- tai hydroksilysiinitähteen OH-ryhmään: kaikilla hydroksyyli-ryhmän sisältävillä aminohapoilla on tavattu O-glykosylaatiota.¹² N-glykosylaatiota puolestaan esiintyy lähes yksinomaan asparagiinitähteissä, jotka sijaitsevat tietyissä konsensussekvensseissä: tällöin glykaani linkittyy amididoksella asparagiinin sivuketjun amiiniryhmään. Myös arginiinin kautta linkittyvä N-glykaanityyppi on tavattu – tässä tapauksessa kyseessä on itseglykosyloituva proteiini.¹³ O- ja N-linkitettyjen glykaanien lisäksi harvinaisempi C-mannosyyliidos tunnetaan. Siinä α -mannosyyli kiinnittyy tryptofaanitähteen C2-hiileen (ei sivuketjuun).¹⁴

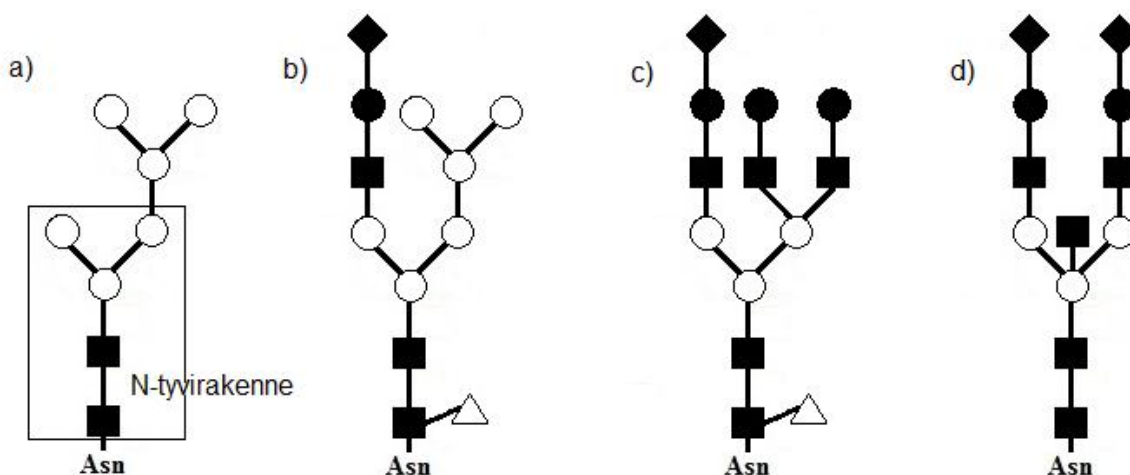
O-glykaanit voivat olla suuria glykosaminoglykaanipitoisia polysakkarideja, jotka muodostavat suurimman osan proteiini-hiilihydraattikompleksin massasta; nämä proteoglykaanit esiintyvät soluväliaineessa, sidekudoksessa ja monien solujen pinnalla. Enimmäkseen O-glykaanit ovat kuitenkin pieniä, yksinkertaisempia ja vähemmän haaroittuneita kuin N-glykaanit, jotka toimivat monesti spesifimmissä tehtävissä. Tässä johdannossa keskitytään ihmisen N-glykoproteiinien biokemiaan niiden ollessa massaspektrometrinen analyysin kohteena.

1.1.1 N-glykaanien rakenteet ja biosynteesi

Ihmisen syntetisoimat glykaanit koostuvat seitsemästä monosakkaridista: glukoosista, galaktoosista, mannoosista, fukoosista, N-asetyyli-glukosamiinista, N-asetyyli-galaktosamiinista ja sialihapoista. Monosakkaridit voivat linkittyä toisiinsa α - tai β -sidoksin ja eri hiilten OH-ryhmien välille muodostaen 1 \rightarrow 2, 2 \rightarrow 3 tai 1 \rightarrow 6 –sidoksia. Nämä sidosvaihtoehdot ja erilaiset monosakkaridisekvenssit mahdollistavat huikean määrän

erilaisia glykaanirakenteita. N-glykaaneilla on kuitenkin määrättyjä rakenteita, joiden pohjana on yhtenevä N-tyvi (*engl.* core). Tyvi koostuu kahdesta N-asetyyli-glukosamiinista ja kolmesta mannoosista (kuva 2).

N-glykaanit jaetaan kolmeen eri päätyyppiin glykaanin koostumuksen perusteella: paljon mannoosia sisältävät (*engl.* high-mannose), kompleksiset eli eri monosakkarideja sisältävät sekä hybridit eli näiden kahden tyypin yhdistelmät. Glykaani voi sisältää vaihtelevan määrän haaroja eli antennejä, jolloin se luokitellaan mono-, bi-, tri- tai tetra-antennaariseksi, ja niin edelleen.



Kuva 2. N-glykaanirakenteita. N-tyvirakenne on kaikissa sama: 2*GlcNAc + 3*Man. Pelkistävän pään GlcNAc voi sisältää $\alpha 1 \rightarrow 6$ -tyvifukoosin. a) High-mannose –tyyppinen glykaani, b) hybridi-tyyppinen, tyvifukosyloitu glykaani, c) kompleksityyppinen, tyvifukosyloitu glykaani (triantennaarinen), d) kompleksityyppinen, bisektinen glykaani (biantennaarinen). Kyseiset rakenteet ovat esimerkkejä tyypillisistä N-glykaanirakenteista; lukemattomia muita tunnettuja ja potentiaalisia rakenteita on olemassa.

N-glykaanin liittäminen vaatii asparagiinitähteen, joka sijaitsee konsensussekvenssissä NXS/T, jossa X voi olla mikä tahansa aminohappo paitsi proliini. Joissakin tapauksissa myös kysteiinin sisältävä sekvenssi NXC sisältää glykaanin; tällaisen sekvenssin glykosylaatio on kuitenkin vähemmän yleistä.¹⁵ Asparagiiniin liittyvää glykaanin N-asetyyli-glukosamiinipäätä kutsutaan pelkistäväksi pääksi, ja sen muut päät ovat vastaavasti ei-pelkistäviä päitä.

Glykaanien biosynteesi ihmisellä

N-glykaanisynteesi alkaa sytoplasmassa dolikoli-linkitetyn ja haarautuneen oligosakkaridin, $\text{Man}_5\text{GlcNAc}_2$, synteesillä. Tämä rakenne kääntyy endoplasma-kalvoston sisään flippaasien katalysoimassa prosessissa, jota ei täysin tunneta,¹⁶ ja sitä pidennetään oligosakkaryyliväliuotteeksi ($\text{Glc}_3\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2$). Tämän molekyylin oligosakkaryylitransferaasi siirtää tuoreen polypeptidiketjun asparagiinitähteelle, ja sitä lyhennetään vaiheittain glukosidaasi I:n, glukosidaasi II:n ja mannosidaasin katalysoimissa reaktioissa. Prosessi on olennainen proteiinin oikealle laskostumiselle ja välttämätön uuden glykoproteiinin kuljetuksessa Golgin laitteelle.^{17,18} Golgin laitteessa poistetaan lisää mannoositähteitä, jolloin tuloksena on jälleen oligosakkaridi $\text{Man}_5\text{GlcNAc}$ – tätä voidaan lyhentää edelleen ja lisätä muita monosakkarideja tai pidentää suoraan mannoositähteillä, jolloin tuloksena on edellä esiteltyjä erityyppisiä N-glykaaneja.

Golgin laitteessa tapahtuu myös fukosylaatio. Glykaanin fukosylaatiosta vastaavat fukosyyliitransferaasit, jotka siirtävät fukoositähteen GDP-fukoosilta glykaanille. Fukosyyliitransferaaseja (Fut) tunnetaan useita, Fut1-Fut9, joista ainoastaan Fut8 vastaa $\alpha 1 \rightarrow 6$ -tyvifukosylaatiosta.¹⁹ Tyvifukosylaation puuttuminen johtaa Fut8-*knock-out*-hiirillä vakavaan kehityksen häiriintymiseen ja kuolemaan muutaman päivän iässä, mutta kuoleman aiheuttavaa mekanismia ei tunneta.²⁰

Glykaanisynteesin säätely

Saman proteiinin erilainen glykosylaatio eri lajeilla ja eri kudoksissa on osoitettu useille proteiineille. Esimerkiksi gamma-glutamyyliitranspeptidaasin glykosylaatiossa havaittiin eroja, kun se eristettiin joko vastasyntyneen hiiren maksasta tai aikuisen hiiren munuaisesta, ja sama ilmiö löydettiin myös rotalla ja naudalla.²¹

Kudoksilla on siis toisistaan poikkeavia glykosylaatiokapasiteetteja, jotka määräytyvät erilaisten intrasellulaaristen glykosyyliitransferaasien ja glykosidaasien ilmentymisen perusteella. Näiden entsyymien aktiivisuuden säätelyllä ei näyttäisi olevan suurta merkitystä nykytiedon mukaan, sillä glykosyyliitransferaasit ja glykosidaasit ovat oletusarvoisesti aktiivisia. Sen sijaan mekanismit, joilla rajoitetaan entsyymien pääsyä glykosyloitavien proteiinien luokse solun sisäisessä kuljetuksessa, voivat olla merkittäviä glykaanien muodostuksessa. Eräiden glykosyyliitransferaasien

kuljetuksessa ER:n ja Golgin laitteen välillä toimivien kaperonien ja proteiinikompleksien menetys vaikuttaa suuresti ilmeneviin glykaaneihin.^{22,23}

1.1.2 N-glykaanien esiintyminen ja tehtävät

Vaikka kaikkia N-glykaanien rooleja ei edelleenkään tunneta, on selvää, että niillä on laaja-alaisesti erilaisia biologisia tehtäviä. Toiset niistä ovat vähemmän merkittäviä, kun taas toiset välttämättömiä elion normaalissa toiminnassa niin molekyylitasolla, solutasolla kuin kudostasollakin. Glykaanien roolit voidaan pääpiirteittäin jakaa kahteen luokkaan: niillä on rakenteellisia ja modulatorisia tehtäviä, ja toisaalta ne toimivat muiden molekyylien spesifisinä tunnistuskohteina.

Laskostuminen

Glykoproteiinien glykosylaatio alkaa välittömästi uuden polypeptidiketjun syntyessä, ja toiminnallista proteiinia ei usein synny ilman sille ominaisia glykaaneja. Translaation jälkeisen glykosyloinnin häiriintyminen ER:ssä haittaa monien proteiinin laskostumista ja solunsisäistä kuljetusta. Tunikamysiini estää glykosylaation solussa, minkä 1970-luvulla havaittiin estävän useiden proteiinien normaalin laskostumisen ja kuljetuksen solukalvolle.^{24,25} Glykaanien vaikutusta laskostumiseen on kokeellisten tutkimusten lisäksi mallinnettu runsaasti. Sopivissa kohdissa hydrofobisessa peptidiketjussa sijaitsevien glykaanien on laskettu nopeuttavan hydrofobista luhistumista (*engl.* hydrophobic collapse) ja uudelleenjärjestäytymistä, kun taas toisaalla ne hidastavat uudelleenjärjestäytymistä. Hydrofobista luhistumista edistää hiilihydraattiketjujen solvataatio, joka ohjaa hydrofobisten rakenteiden hautautumista.^{26,27} Glykosylaatio ei kuitenkaan automaattisesti nopeuta laskostumista kaikilla glykoproteiineilla. Verrattaessa normaalin erytropoeitiinin (EPO) ja ei-glykosyloidun EPO-mutantnin laskostumista huomattiin ei-glykosyloidun muodon laskostuvan nopeammin sekä välimuotoonsa että lopulliseen natiiviin muotoonsa. Mahdollisesti merkittävää evolutiivista painetta ei kohdistu nopeampaan laskostumiseen, kun glykosylaatio toisaalta destabiloi laskostumatonta konformaatiota ja estää EPO:n aggregoitumista.²⁸

Tunnistus ja signalointi

N-glykaaneja tunnistavat sekä elion omat solut ja molekyylit että patogeenien pintarakenteet. Ne vuorovaikuttavat entsyymien, vasta-aineiden ja glykaaneja sitovien

proteiinien kanssa. Glykaanien sitoutuminen niitä tunnistaviin proteiineihin on pääasiallinen keino, jolla glykaanirakenteen sisältämä informaatio välittyy eteenpäin ja johtaa biologisiin toimintoihin.²⁹ Tässä esitellään esimerkinomaisesti vain muutamia N-glykaanien sitoutumiseen liittyviä mekanismeja ja sen vaikutuksia; niitä tunnetaan lukemattomia.

Mikrobien pintalektiinien tehtävänä on tarttua kohdesolun pinnan glykaaneihin, mikä on välttämätöntä infektion aikaansaamiseksi. Sellaisilta mikrobimutanteilta, joilta lektiinit puuttuvat, puuttuu normaalisti myös kyky infektoida.^{30, 31} Infektiota on myös mahdollista estää liukoissa hiilihydraatti-inhibiittoreilla, jotka sitoutuvat mikrobin lektiineihin estäen sen sitoutumista kohdesolun glykaaneihin. Vaikutus on havaittu sekä *in vitro* että *in vivo*.³²

Luontaisessa immuniteetissa on glykaaneilla merkittävä rooli. Leukosyyttien pyöriminen ja kiinnittyminen verisuonten epiteeliin perustuu selektiinien sialyyli-Lewis X –tetrasakkaridin sitomiseen. Vaikka suurin osa sialyyli-Lewis X –rakenteista on kiinnittynyt O-linkitettyihin glykaaneihin, on myös N-linkitettyillä glykaaneilla havaittu olevan erittäin tärkeä rooli L-selektiinivälitteisessä lymfosyyttien kiinnittymisessä.³³

Integriinien N-glykosylaatio vaikuttaa niiden toimintaan adheesioreseptoreina. Samalla kun integriinivälitteinen tarttuminen perustuu sen alfa- ja beta-alayksiköiden sitoutumiseen tiettyyn peptidisekvenssiin, vaikuttaa sitoutumisen vahvuuteen integriinin glykosylaatio.³⁴ Hiljattain havaittiin synaptisen soluadheesiomolekyylin (*engl.* synaptic cell adhesion molecule, SynCAM) N-glykosylaation vaikuttavan sen sitoutumisen voimakkuuteen: glykaani tietyissä N-glykosylaatiokohdissa vahvisti sitoutumista.³⁵

1.2. Proteiinien N-glykosylaation kliiniset merkitykset

N-glykosylaation ollessa hyvin yleinen modifikaatio proteiineissa ja sen vaikuttaessa kaikkialla ihmiselimestössä proteiinien normaaliin toimintaan ei ole yllättävää, että muutokset siinä kertovat usein muutoksista tietyissä systeemeissä. Näin ollen useiden sairauksien synty ja eteneminen näkyy myös glykaanien tasolla.

1.2.1. N-glykosylaation muutokset syövässä

Muutokset glykosylaatioissa ovat syöpäsolujen yleispätevä piirre ja kertovat kasvaimen etenemisvaiheesta.²⁹ Glykosylaatio voi muuttua usealla tavalla: tiettyjen rakenteiden ilmenemisen loppuminen tai runsastuminen, rakenteiden jääminen vajaiksi, välivaiheiden kertyminen ja uusien rakenteiden ilmeneminen ovat kaikki havaittuja muutoksia syöpäsoluissa. Syöpäsolun glykosylaation muuttuminen ei ole satunnainen ilmiö, vaan koska syövän edistyminen on eräänlainen mikroevolutionäärinen prosessi, vain syöpäsolun kasvua ja lisääntymistä edistävät muutokset säilyvät. Näin muuntunut glykosylaatio on yleensä jollain mekanismilla syövän etu.

Kasvaimista eristettyjen glykopeptidien suuri koko on selitettävissä N-glykaanien β 1–6-haaroittumisen lisääntymisellä, mikä johtuu DP-GlcNAc:N-glykaani-GlcNAc-transferaasia koodaavaan Mgat5-geenin voimistuneesta ekspressiosta. Tämän geenin hiljentäminen mm. pienentää solujen kokoa sekä häiritsee niiden glukoosin kuljetusta ja proteiinisynteesiä. Mahdollista on, että kompleksiset N-glykaanit herkistävät syöpäsoluja kasvutekijöille.³⁶

Myös sialyloinnin on havaittu lisääntyvän syöpäsoluissa.³⁷ Varhainen havainto vehnäniituagglutiinin kyvystä sitoa eläinsyöpäsoluja selittyy niiden pintaproteiinien lisääntyneillä sialihappotähteillä; pinnan sialylointi vähentää syöpäsolun tarttumista soluväliaineeseen, mikä saattaa suojata niitä komplementin aktivoitumiselta vaihtoehtoisen reaktiotien kautta.³⁸

Fukoosin lisääntyminen pahanlaatuisista kasvaimista eristetyissä glykoproteiini-fraktioissa havaittiin jo 1970-luvulla ensimmäistä kertaa.³⁹ Maksassa Fut8:n ilmeneminen on normaalisti suhteellisen vähäistä, ja siksi plasman proteiineista vain melko pieni osa on tyvifukosyloituja. Hepatosellulaarisessa karsinoomassa eli maksasolusyövässä kuitenkin tyvifukosylaatio lisääntyy selvästi, jolloin useita maksassa syntetisoitavia proteiineja voidaan käyttää merkkiaineina.⁴⁰ Tällainen merkkiaine on AFP-L3 (fukosyloitu α -fetoproteiini) – Fut8:n lisääntymisen lisäksi sen synteesi vaatii UDP-fukoosin pitoisuuden kasvun, joka on seurausta GDP-fukoosisyntaasin lisääntyneestä ekspressiosta.⁴¹ Näin monet fukosylaatioreitin entsyymeistä näyttäisivät olevan yhdessä säädeltyjä.

On myös ehdotettu, että tyvifukosyloitujen glykoproteiinien lisääntynyt erityys maksasta vereen syövän yhteydessä johtuisi hepatosyyttien depolarisoitumisesta:

normaalisti tyvifukosyloituja proteiineja ohjautuu hepatosyyttien apikaalisen pinnan kautta sappeen, mutta depolarisoitumisen johdosta ne pääsevät rikastumaan vereen.⁴²

HCC:n lisäksi tyvifukosylaation lisääntymistä tai vähentymistä on viime vuosina havaittu esimerkiksi eturauhassyövässä, haimasyövässä ja paksusuolen syövässä.⁴³⁻⁴⁵

Uusien syöpämerkkiaineiden löytyminen voi helpottaa seulontaa ja nopeuttaa diagnoosia, jos koepalan otto ei ole enää syövän tunnistamiseksi välttämätöntä.

1.2.2. N-tyvifukosylaatio muissa patologisissa tiloissa

Vaikka tyvifukosylaation lisääntymisestä erilaisissa syövässä on eniten tutkimustietoa, on fukosylaatiomuutoksia voitu havaita myös muiden sairauksien yhteydessä.

Muutokset immunoglobuliinien glykosylaatioissa on yhdistetty erilaisiin inflammatio-sairauksiin. Eri IgG-muodot (IgG1-4) muodostavat yhdessä suurimman osan veren vasta-aineista, ja niiden kokonaispitoisuus on luokkaa 10 mg/ml.⁴⁶ Näin ollen IgG on veren ylivoimaisesti yleisin tyvifukosyloitu proteiini. Fukosylaation vaikuttaa IgG:n toimintaan: tyvifukoosin puuttuminen IgG1:n N-glykaanista on osoitettu johtavan sen tehostuneeseen sitoutumiseen makrofagien Fcγ-reseptori IIIa:han, mikä johtaa lisääntyneeseen vasta-aineriippuvaiseen solusyto-toksisuuteen (*engl.* ADCC, antibody-dependent cellular cytotoxicity).⁴⁷ Tällä saattaa olla merkitystä vasta-ainevälitteisissä autoimmuunisairauksissa.⁴⁸

Amyotrofinen lateraaliskleroosi eli ALS-tauti on ylempiä ja alempia liikehermoja rappeuttava motoneuronitauti. Hiljattain ALS-potilaiden IgG:ssä havaittiin verrokkeja useammin tietty glykaanityyppi: galaktosyloitu, bisektinen ja defukosyloitu N-glykaani.⁴⁹ Psoriasispotilailla puolestaan on havaittu muutoksia haptoglobiinin N-glykosylaatioissa. Sekä tyvifukosylaatio että tri- ja tetra-antennaaristen glykaanien määrä oli merkittävästi lisääntynyt potilailla verrattuna terveisiin verrokkeihin.⁵⁰

1.3. Lyhyesti glykoproteiinianalytiikasta

Aiemmin strategia proteiineihin kiinnittyneiden glykaanien analysoimiseksi on ollut niiden entsyymaattinen tai kemiallinen irrottaminen, mikä johtaa kompleksiseen seokseen erilaisia glykaaneja. Nämä vapaat glykaanit ovat profiloitavissa kromatografisin menetelmin. Glykaanit voidaan leimata kemiallisella tai radioaktiivisella leimalla niiden detektoimiseksi. Rakenteellista tietoa voidaan saada

eksoglykosidaasien avulla tarkkailemalla käsitellyn glykaanin eluution tai migraation muutosta – tämä vaatii vertailua tunnettuihin standardeihin.⁵¹

Edellä esitellyn toimintastrategian haittapuolena on sen työläyden lisäksi glykaanien paikkatiedon menetys. Nykyään massaspektrometriset menetelmät ovatkin hyvin pitkälti korvanneet perinteiset menetelmät, joten tässä johdannossa keskitytään jatkossa MS-analytiikkaan.

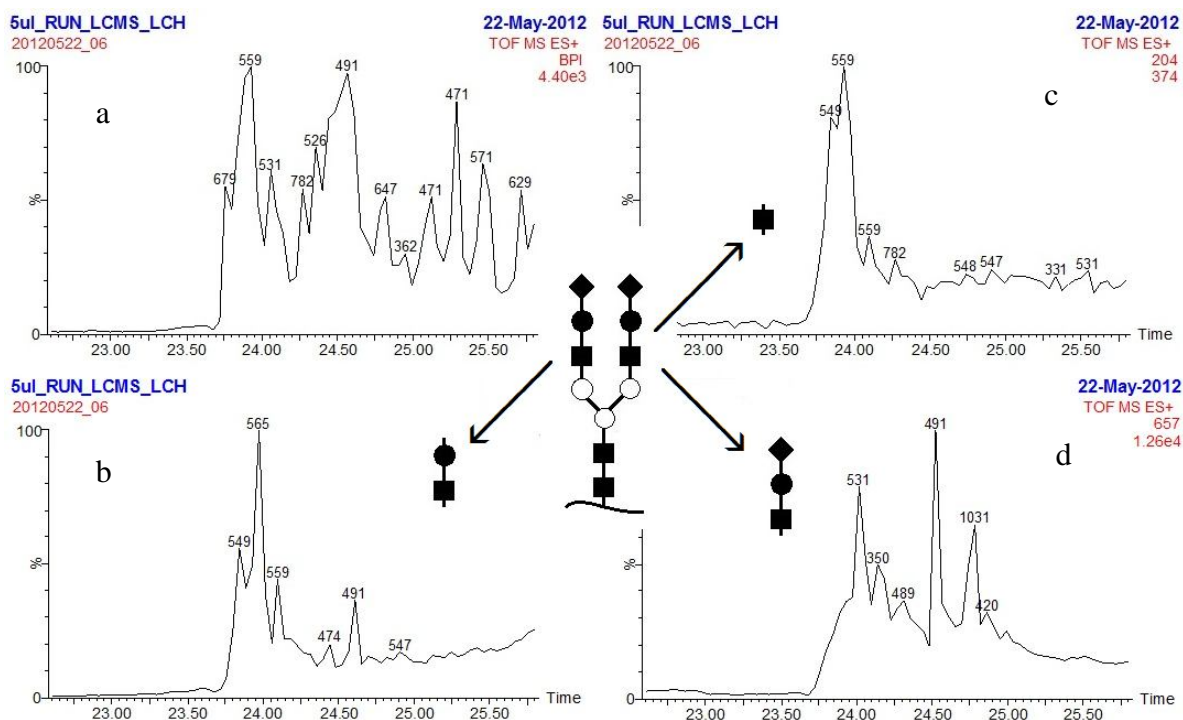
1.4. Massaspektrometria glykoproteiinianalytiikassa

1.4.1. Historiaa

Massaspektrometrian rooli glykoproteomiikan kehityksessä on ollut korvaamaton. Pian ensimmäisten massaspektrometrinen peptidianalyysien^{52,53} jälkeen massaspektrometriaa sovellettiin myös glykopeptidianalytiikkaan eräiden jäätyminenestoproteiinien rakenteen selvityksessä.⁵⁴ Peptidin massasormenjälki – metodia (*engl.* Peptide mass fingerprinting) käytettiin aluksi erityisesti biotekniikassa rekombinantti-proteiinien sekvenssin tarkistukseen, ja tietotekniikan kehittyessä mahdollistui sormenjäljen vertaaminen tietokantojen proteiinisekvensseihin proteiinin identifioimiseksi; näin säästyttiin *de novo* –sekvensoinnilta, joka on hyvin vaativaa.⁵⁵ ⁵⁶ Sormenjälki-metodin vahvuutena oli translaation jälkeisten modifikaatioiden havaitseminen; näitä ei Edman-sekvensoinnilla nähty. Glykosylaation määrittäminen massaspektrometrian avulla avasi aivan uuden tutkimuskentän glykobiologian alalle. Conboy ja Henion sovelsivat CID-tekniikkaa (*engl.* Collision Induced Dissociation) glykaanin fragmentoimiseen, ja käyttivät glykoproteiineille karakterisia ioneja m/z 204 ja 366 niiden havaitsemiseksi näytteestä.⁵⁷

1.4.2. Glykopeptidien detektointi näytteestä

Glykopeptidien tunnistukseen yleisesti käytettäviä ns. reportteri-ioneja ovat mm. N-asetyyliheksaosiini m/z 204,1, heksoyliheksaosiini m/z 366,1 ja sialihapot m/z 292,3.^{57,58} Nämä fragmentit tarjoavat selektiivisen glykopeptididetektion tuntemattomasta peptidinäytteestä käytettäessä prekursori-ioniskannausta (kuva 3).



Kuva 3. Plasmanäytteen LC-MS-kromatogrammi piirrettynä a) korkeimman piikin intensiteettinä (BPI, Base peak intensity), b) ionin 366 intensiteettinä, c) ionin 204 intensiteettinä ja d) ionin 657 intensiteettinä. Nämä glykomarkkerit osoittavat glykopeptidien retentioajan.

1.4.3. Glykopeptidien fragmentointi ja MS/MS-spektrin analyysi

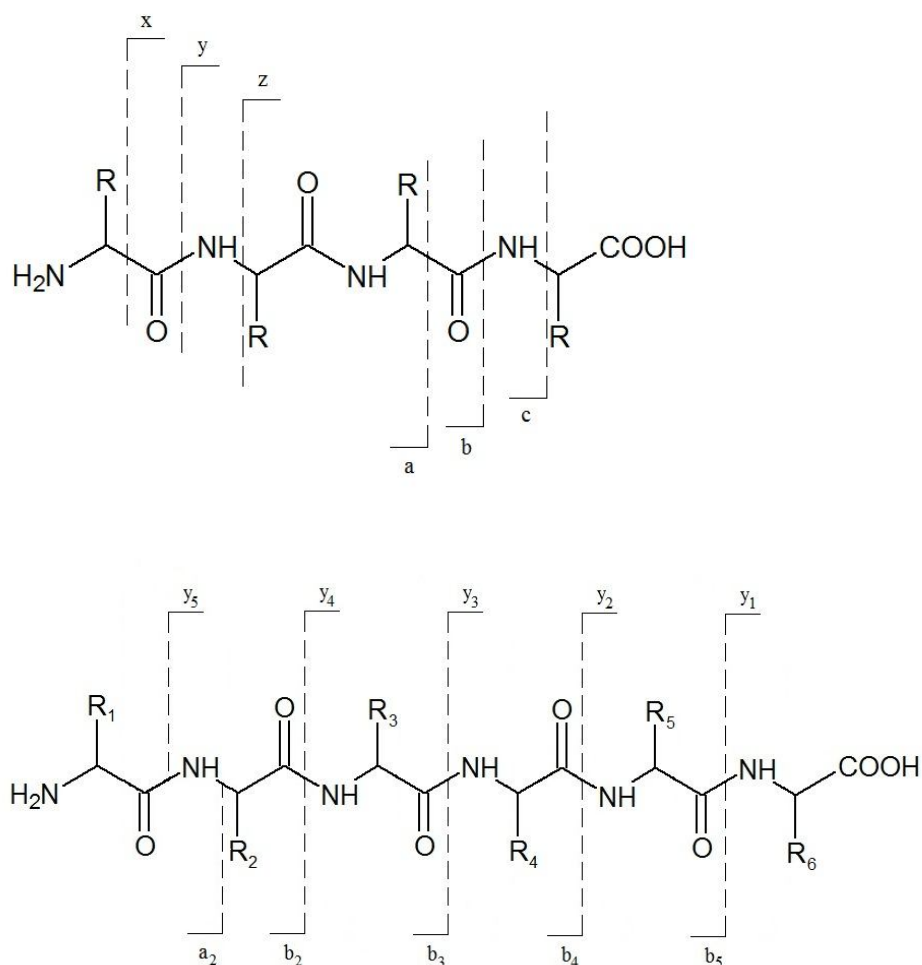
Glykopeptidien fragmentointiin käytetään yleisimmin törmäysindusoitua dissosiaatiota (CID, *engl.* Collision Induced Dissociation). Tässä menetelmässä analyytipeptidit törmäytetään inertin kaasun kanssa (N_2 , Ar, He) erillisessä törmäyskammiossa tai ioniloukussa. Törmäyksessä osa peptidin etenemisliikkeen liike-energiasta muuttuu sen sisäiseksi värähdysenergiaksi, joka indusoi fragmentoitumisen.

Polypeptidissä on useita potentiaalisia sidoksen katkeamiskohtia, ja niitä kuvaamaan käytetään alun perin Roepstorffin ja Fohlmannin ehdottamia, sittemmin vakiintuneita kirjainmerkintöjä (kuva 4).⁵⁹ CID:ssa peptidirungon hajoaminen tapahtuu niissä sidoksissa, joiden katkeaminen vaatii vähiten energiaa – nämä ovat yleensä amidisidoksia. Katkeamisessa syntyy siis pääasiassa y-ioneja, joissa varaus jää karboksiterminaalille päälle, tai b-ioneja, joissa varaus jää aminoterminalille päälle. Näin ollen y-ionit ovat protonoituneita aminohappoja tai protonoituneita peptidintynkiä.⁶⁰ Sen sijaan b-ionit ovat monimutkaisempia ja muuntuvampia, eikä b-ionisarja ole stabiili kuten y-ionisarja.⁶¹

Tyypillisesti trypsiinidigestiossa syntyneiden, emäksisen aminohappotähteen C-päässä sisältävien peptidien CID-spektrissä nähdään pitkä y- ja lyhyt b-ionisarja. Jos N-päässä on emäksinen aminohappotähteen, voi kuitenkin b-sarja olla täydellisempi ja y-sarja lyhempi.⁶² Peptidien CID-spektrissä ei normaalisti havaita b₁-ionia, jonka sijaan a₂-ioni voidaan monesti nähdä. Syynä b₁-ionin puuttumiselle on, ettei karbonyylihappi herkästi protonoidu aminohapoilla. Eräillä riittävän vahvan nukleofiilin sijaitessa N-päässä saadaan toisinaan myös b₁-ioni syntymään; histidiinin, arginiinin tai lysiinin sisältävien dipeptidien on osoitettu tuottavan stabiilin b₁-ionin.⁶³ N-glykopeptidien ollessa kyseessä on glykaanin kiinnittymiskohdassa kolmen aminohapon konsensussekvenssi NXS/T/C, josta ei dipeptidejä trypsiinidigestiossa synny.

Syntyviä y- ja b-sarjoja käytetään aminohapposekvenssin määrittämiseen. Yhdesti tai kahdesti⁶⁴ sekä kolmesti⁶⁵ varautuneen peptidin fragmentoitumisprosessi on mallinnettu kvantitatiivisesti ja mallin on osoitettu vastaavan kokeellisesti havaittua fragmentoitumista hyvin. Useasti varautuneista peptideistä saadaan täydellisempi spektri kuin yhdesti varautuneista, jotka tuottavat aina myös näkymättömiä neutraaleja fragmentteja.

Peptidille varauksen antava protoni voi olla lokalisoitunut tai mobiili, mikä vaikuttaa suuresti varauksen jakautumiseen fragmentaatiossa. Tryptisissä peptideissä on karboksiterminaalisisessa päässä joko arginiini tai lysiini, joista edellinen on emäksisempi ja lokalisoi tehokkaasti protonin. Näin syntyy pääasiassa y-ioneja. Lysiinin sisältävissä peptideissä protoni on sen sijaan liikkuvampi, jolloin erilaisia protonoituneita peptidimuotoja esiintyy. Mobiilin protonin on havaittu edistävän katkeamista haaroittuneiden aminohappojen (Ile, Val, Leu) C-terminaaliselta puolelta.

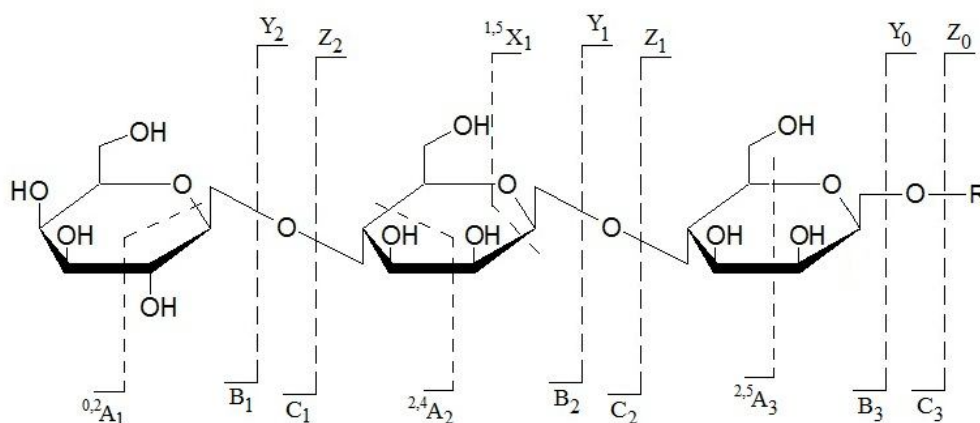


Kuva 4. Fragmentoinnissa syntyvien a-, b- ja c- sekä x-, y-, ja z-ionien katkeamiskohdat polypeptidissä.

Jokainen peptidifragmentti CID-spektrin piikkisarjassa eroaa edellisestä yhden aminohapon osalta; siksi on periaatteessa mahdollista määrittää aminohapposekvenssi vierekkäisten piikkien massaeron avulla. Ongelmia syntyy kuitenkin siitä, että peptidin MS/MS-spektri on harvoin täydellinen jokaisen aminohappoeron osoittava sarja, ja toisaalta siitä, että joukossa saattaa olla tuntemattoman fragmentoitumisprosessin synnyttämiä piikkejä. Täten MS/MS-spektrin käyttö *de novo* -sekvensointiin edellyttää riittävän laadukasta spektriä ja tuntemusta erilaisten aminohapposekvenssien taipumuksesta katketa.

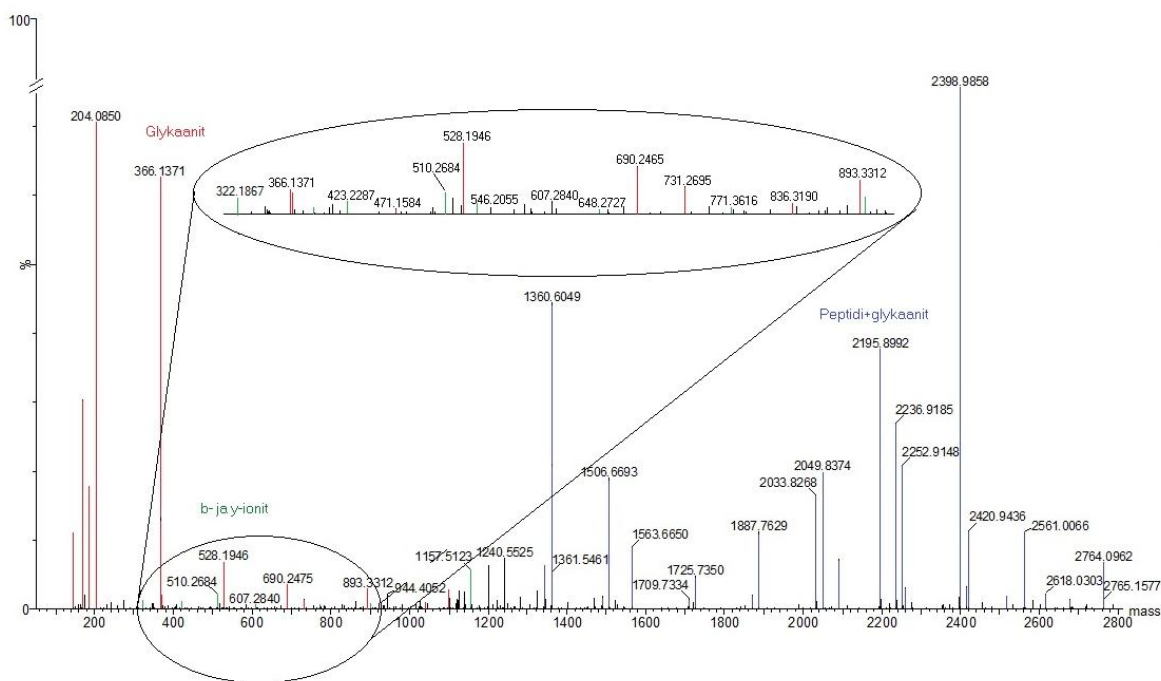
Glykopeptidin ollessa kyseessä saadaan aminohapposarjan lisäksi korkeammalle m/z-akselille monosakkaridisarja, joka syntyy glykopeptidin fragmentoitua eri kohdista glykaania. Yleisesti tapahtuu kahdenlaista glykaanin fragmentoitumista: glykosidi-

sidosten katkeamista tai renkaan halkeamista (*engl.* cross-ring cleavage).⁶⁷ Halkeamisessa katkeaa aina kaksi sidosta. Samoin kuin peptidin fragmentoinnissa, myös glykaanin hajotuksen antama ionisarja nimetään Y- ja B-sarjaksi; glykaanien tapauksessa käytetään isoja kirjaimia (kuva 5). Glykosididisidosten katkeaminen vapauttaa kokonaisia monosakkarideja ja antaa tietoa glykaanin sekvenssistä sekä haaroittumisesta; renkaan halkeamisesta syntyneet ionit tarjoavat lisäksi tarkennettua tietoa sokereiden linkitysasemista haarautumisissa.^{68, 69}



Kuva 5. Glykaanin fragmentoitumisessa syntyvät A-, B- ja C- sekä X-, Y- ja Z-ionit. Glykaaneilla tapahtuu sekä monosakkaridien välisiä katkeamisia että renkaan halkeamisia.

Protonoitunut glykaani fragmentoituu huomattavasti alhaisimmilla törmäysenergioilla kuin peptidi.^{70,71} Tämä tuottaa ongelmia täydellisen monosakkaridi- ja aminohapposekvenssin näkymisessä samassa spektrissä: peptidisarjan piikit ovat intensiteetiltään kertaluokkaa pienempiä kuin glykaanisarjan (kuva 6).



Kuva 6. Glykopeptidin CID-spektri. Korkean intensiteetin piikit pienillä (merkitty punaisella) ja suurilla (merkitty sinisellä) massa-alueilla syntyvät glykaanin fragmentoitumisesta. Peptidin fragmentoitumisesta syntyvät b- ja y-ionipiikit (merkitty vihreällä) jäävät samalla törmäysenergiolla pieniksi.

CID:n lisäksi myös muita fragmentointimenetelmiä on käytetty glykopeptidianalytiikassa. Infrapunasäteilykuumennukseen perustuvassa IRMPD:ssä (*engl.* Infrared Multi Photon Dissociation) peptidi-ionit kuumenevat, kunnes alkavat dissosioitua; syntyvä spektri on samankaltainen kuin CID:ssä.⁷² Elektroninsiieppaus-dissosiaatio (ECD, *engl.* Electron Capture Dissociation) sen sijaan tuottaa erilaisen spektrin: siinä labiilit peptidimodifikaatiot, kuten glykaanit, säilyvät hyvin ja peptidirunko hajoaa pääasiassa z- ja c-ioneiksi.^{73,74} Myös uudempi, vuonna 2004 julkaistu menetelmä elektroninsiirtodissosiaatio (ETD, *engl.* Electron Transfer Dissociation) tuottaa z- ja c-ioneja säilyttäen glykosylaatiot ja fosforylaatiot.⁷⁵ ETD:n etuna on toimivuus suurien (yli 14 aminohapon) ja useasti varautuneiden ($z \geq +3$) peptidien analytiikassa.⁷⁶

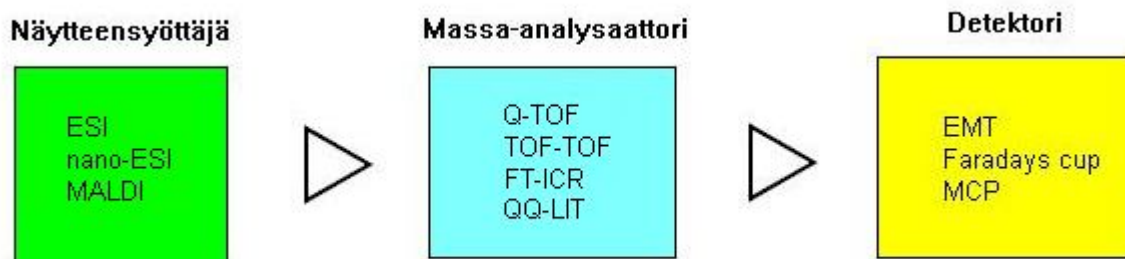
1.4.4. Massa-analysaattorit

Massaspektrometrissa massojen erotus sekä tandem-massaspektrometriassa massan valinta ja ionin fragmentointi tapahtuvat massa-analysaattorissa. Proteiinien MS-analytiikassa käytetään nykyään eniten kvadrupoli-lentoaika-analysaattoria (Q-TOF, *engl.* quadrupole time-of-flight), lentoaika-lentoaika-analysaattoria (TOF-TOF) ja Fourier-muunnos-ionisyklotroniresonanssi-analysaattoria (FT-ICR).⁷⁷

TOF-analysaattorissa ionit erotellaan toisissaan lentoajan perusteella kiihdyttämällä niitä sähkökentässä ja antamalla niille kaikille sama tunnettu kineettinen energia tunnetulla matkalla. Tällöin massaltaan pienemmät ionit liikkuvat nopeammin kuin suuremmat ja saapuvat detektorille aiemmin. Käytettäessä Q-TOF:a kvadrupoli toimii ioniohjaimena MS-analyysissä tai törmäyskammiona MS/MS-analyysissä. TOF-TOF:ssa prekursorit valitaan ensimmäisessä TOF:ssa ja fragmentit analysoidaan toisessa TOF:ssa. Aiemmin fragmentointi tapahtui virittämällä ionit jo MALDI-ionilähteessä yli sen vibraatiotason, joka johtaa niiden hajoamiseen viiveellä (*engl.* post source decay).⁷⁸ Tällaisen hajoamisen tuottama spektri oli kuitenkin sekvensoinnin kannalta usein puutteellinen. Nykyisin CID-tekniikkaa sovelletaan myös TOF-TOF-analyysissä, jolloin fragmentointi tapahtuu vasta törmäyskammiossa.⁷⁹ TOF-TOF soveltuu käytettäväksi vain MALDI-ionilähteen kanssa, kun taas Q-TOF:a voi käyttää sekä ESI:in että MALDI:in yhdistettynä (ks. 1.3.5.).

Analysaattoreista parhaan massatarkkuuden ja korkeaimman resoluution tarjoaa ESI-lähteeseen yhdistetty FT-ICR, jolla voidaan suorittaa mittauksia jopa alle 1 ppm tasolla.^{80, 81}

Aiemmin yleistä kolmoiskvadrupolia (QQQ) tai kvadrupoli-kvadrupoli-ioniloukkua (QQ-LIT) käytetään nykyään harvemmin proteiini-analytiikassa niiden heikon resoluution ja keskinkertaisen massatarkkuuden vuoksi. Niiden etuna on kuitenkin mahdollisuus markkeri-ionien avulla tehokkaasti tunnistaa ja valita MS/MS-analyysiin vain spesifisiä rakenteita omaavat molekyylit, kuten fosforyloidut tai glykosyloidut proteiinit.⁵⁷



Kuva 7. Massaspektrometrin perusosia ovat näytteensyöttäjä, massa-analysaattori ja detektori. Peptidianalytiikkaan soveltuvia pehmeitä näytteensyöttömenetelmiä ovat sähkösumutus (ESI) ja matriisiavusteinen laserdesorptio/ionisaatio (MALDI). Eräs yleisesti käytetyistä analysaattoreista on kvadrupoli-lentoaika-analysaattori (Q-TOF). EMT = electron multiplier tube, elektroni-monistusputki. MCP = microchannel plate, mikrokanaalevy.

1.4.5. MS-näytteensyöttömenetelmät

Peptidianalytiikka vaatii niin sanotun pehmeän näytteensyöttötekniikan, jossa molekyyli varautuu ilman huomattavaa fragmentoitumista. Yleisesti käytössä on sähkösumutus (ESI, *engl.* electrospray ionization) ja matriisiavusteinen laserdesorptio/ionisaatio (MALDI, *engl.* matrix-assisted laser desorption/ionization), joskin nopeaa atomipommistusta (FAB, *engl.* fast atom bombardment) käytettiin glykopeptidi-MS-analytiikan alkuaikoina.⁸²

MALDI:ssa näyte on sekoitettu kiteiseen matriisiin, johon kohdistetaan UV-lasersäde. Matriisi on valmistettu yhdisteistä, jotka absorboivat säteilyä käytetyllä aallonpituudella, mikä johtaa matriisin ylimmän kerroksen ablaatioon. Ionisaatio tapahtuu tässä kuumassa, irronneessa klusterissa. MALDI:ssa syntyy vähemmän useasti varautuneita ioneja kuin ESI:ssä, minkä on esitetty johtuvan klusterin vapaiden elektronien aiheuttamasta varausten uudelleenneutraloitumisesta.⁸³

ESI:ssä näyteliuos sumutetaan hienoksi aerosoliksi varautuneen kapillaarin läpi. Pisarakoon pienentämiseksi liuottimessa käytetään konduktiivisuutta lisääviä aineita kuten etikka- tai muurahaishappoa. Liuotin haihtuu syntyneistä pisaroista, kunnes varautunut pisara muuttuu epästabiiliksi saavuttaessaan ns. Rayleighin rajan. Tällöin pisara käy läpi Coulombin fission, jossa se sinkoaa varautuneita partikkeleita ympärilleen. Ionisaatiomekanismille on kaksi teoriaa: ionin haihtumisen malli (*engl.* ion evaporation model) ja varausjäännösmalli (*engl.* charge residue model). Ensimmäisessä esitetään haihtuvan pisanan pinnan kenttävoimakkuuden käyvän

riittävän suureksi varautuneiden molekyyliden irtoamiselle. Toisessa oletetaan jokaisen pisaran sisältävän vain yhden analytti-ionin, joka vapautuu liuottimen haihtuessa. Todennäköistä on, että molemmat mekanismit ovat oikeita, ja ionin haihtumista tapahtuu pienempien molekyyliden kohdalla, kun taas varausjäännösmalli selittää paremmin suurten molekyyliden ionisoitumisen.⁸⁴

Usein kromatografinen erotus digestiossa syntyneille peptideille suoritetaan käänteisfaasipylvään läpi HPLC-laitteella, joka on useimmiten kytkettynä suoraan (online) MS-ionilähteeseen; tällöin ionisointi tapahtuu sähkösumutuksella. Tässä työssä käytettiin pienen virtauksen nano-ESI-ionilähdettä, jolla on pienemmän näytteenkulutuksen lisäksi muitakin etuja. Nano-ESI tuottaa pienempiä pisaroita, jolloin pisaran pinta-ala on suuri suhteessa sen tilavuuteen – näin useimmat analyttimolekyylit voivat desorptoitua.⁸⁵

1.4.6. Glykoproteiinien rikastus

Affiniteettikromatografia

Koska lektiinit ovat glykaaneja sitovia proteiineja, on niitä käytetty glykoproteiinien rikastukseen laajasti. Viimeisten vuosikymmenten aikana on saatu yksityiskohtaista tietoa monien kasvipäristen lektiinien spesifisyydestä, jolloin niitä on voitu käyttää tarpeen mukaan tiettyjen glykaanityyppien sitomiseen.⁸⁶ Yleisesti käytettyjä lektiinejä ovat esimerkiksi konkanavaliiniagglutiniini (ConA, eristetty alun perin *Canavalia ensiformis* -kasvista), vehnäniituagglutiniini (*engl.* wheat germ agglutinin, WGA), linssiagglutiniini (*engl.* *Lens culinaris* agglutinin, LCA) sekä maapähkinäagglutiniini (*engl.* Peanut agglutinin, PNA).⁸⁷⁻⁸⁹

Tässä työssä valittiin käytettäväksi lektiinejä, joilla tiedetään olevan affiniteettia fukoosiähteisiin. LCA sitoutuu erityisesti tyvifukosyloituihin, mono- ja biantennaarisiin glykaaneihin, kun taas *Aleuria auraria* –lektiini (AAL) myös glykaanihaarojen fukoosiin.⁹⁰ Näiden kahden lisäksi käytössä oli piikkiherneen lektiini eli *Ulex europaeus* –agglutiniini I (UEA), jolla niin ikään on laaja affiniteetti α -fukoosiin.⁹¹

Käytettäessä lektiinejä glykoproteiinien tai –peptidien rikastukseen sidotaan ne yleensä kovalenttisesti johonkin kantajaan, joka on yleisimmin agarosigeeli.

HILIC

Analyyttien erilaiseen hydrofiilisyyteen perustuvassa HILIC-menetelmässä (hydrophilic interaction chromatography) pooliset analyytit poolittomassa liuottimessa pidätyvät poolittomaan stationäärifaasiin ja eluoituvat lisääntyvän hydrofiilisyyden järjestyksessä. Glykoproteiinit ovat ei-glykosyloituja proteiineja poolisempia, joten ne eluoituvat myöhemmin. HILIC:iä on onnistuneesti käytetty glykoproteiinien rikastuksessa.^{92, 93}

2. TUTKIMUKSEN TARKOITUS

Tämän tutkimuksen tarkoituksena oli selvittää, tulkitseeko Glycopeptide ID –spektrintulkintaohjelma tyvifykosyloitujen glykoproteiinien rakenteen oikein niiden MS/MS-spektreistä. Standardina käytettiin IgG-malliainetta, jonka tiedetään sisältävän fukoosin glykaanin tyvi-N-asetyyllukosamiinin $\alpha 1 \rightarrow 6$ -asemassa. Lisäksi tutkittiin tyvifykosyloitujen glykoproteiinien tunnistusta plasmanäytteestä.

3. MATERIAALIT JA MENETELMÄT

3.1. Reagenssit ja materiaalit

Ihmisen seerumin IgG, L-fukoosi, α -metyylimannosidi, α -metyyliglykosidi, trypsiini ja α -L-fukosidaasi hankittiin Sigma-Adrichilta (St. Louis, MO, USA). Agaroosiin sidotut lektiinit hankittiin Vector Labsilta (Burlingame, CA, USA). HiTrap-pyläs albumiinin ja IgG:n poistoon hankittiin GE Healthcarelta (Uppsala, Ruotsi). C-18 Spin Column –sarja hankittiin Thermo Scientificilta (Rockford, IL, USA). Ihmisen veri otettiin perusterveeltä vapaaehtoiselta.

3.2. Laitteisto

3.2.1. Nestekromatografia

Käytössä oli kaksi LC-MS-laitteistoa, joista toista käytettiin näytteiden alustaviin analyyseihin ja toisella suoritettiin lopulliset ajot. Edellisessä Waters/Micromass Q-TOF Ultima-massaspektrometriin oli liitetty Waters CapLC –kapillaari-

nestekromatografi; jälkimmäisessä Waters Synapt G2 HDMS –massaspektrometriin liitetty nestekromatografialaitteisto oli Waters NanoAcquity UPLC.

3.2.2. Massaspektrometria

Sekä alustaviin että lopullisiin analyysihin käytettiin kvadrupoli-lentoaika-massaspektrometria (Q-TOF, *engl.* quadrupole time-of-flight). Waters/Micromass Q-TOF Ultima oli käytössä alustavissa määrityksissä. Lopullisiin massaspektrometriin määrityksiin käytettiin Waters Synapt G2 HDMS -laitetta.

Waters/Micromass Q-TOF Ultiman toimintaperiaate

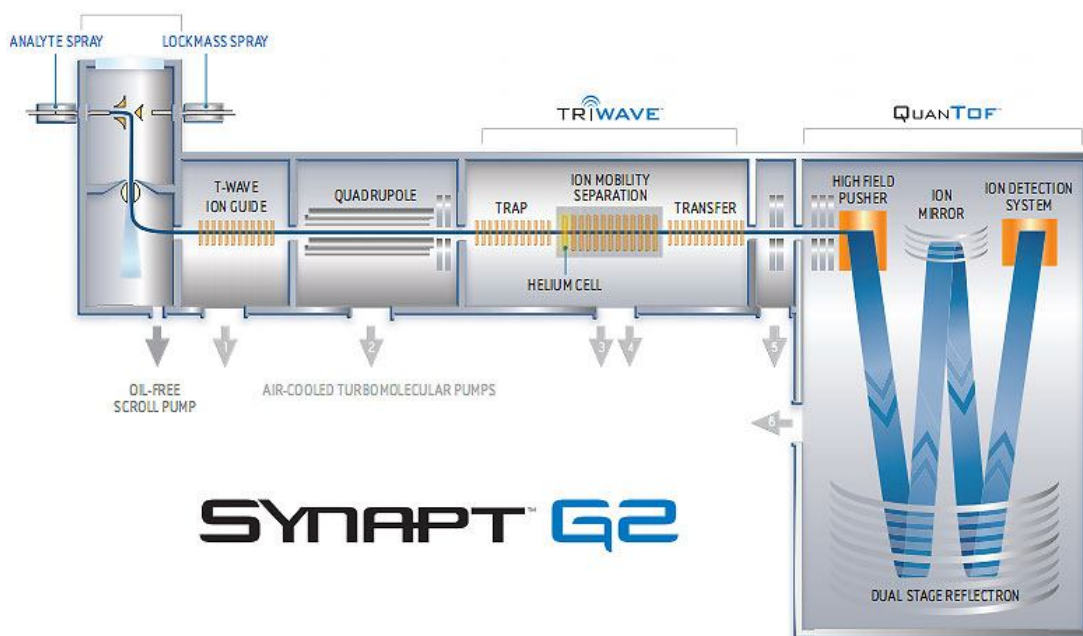
Waters/Micromass Q-TOF Ultima on hybridimassaspektrometri, jossa kvadrupoli toimii MS-analyysissä ioniohjaimena ja MS/MS-analyysissä prekursorin valitsijana. Ionit analysoidaan heijastava TOF-analysaattori, joka sijaitsee ortogonaalisesti kvadrupoliin nähden. Kvadrupolin ja TOF-analysaattorin välissä on törmäyskammio, jossa fragmentointi tapahtuu MS/MS-analyysissä. Detektorina toimii herkkä mikrokanavalevy.

Ionit syntyvät nano-ESI-lähteessä ja kulkevat laitteeseen jännitekartion läpi Z-muotoista reittiä pitkin, jolloin neutraalit molekyylit ja liuotin kulkevat suoraan eivätkä päädy pidemmälle laitteiston sisään.

Waters Synapt G2 HDMS:n toimintaperiaate

Waters Synapt G2 HDMS –massaspektrometrissä ionit ohjataan T-wave –ioniohjaimen kautta kvadrupoliin, jota käytetään RF-kvadrupolina ionien ohjaukseen MS-analyysissä tai prekursorin valintaan MS/MS-analyysissä. Tri-wave-ioniohjaimessa ionit voidaan erotella liikkuvuuden perusteella (IMS, *engl.* Ion Mobility Separation), mutta tämä heikentää herkkyyttä, eikä sitä siitä syystä tässä työssä tehty. Fragmentointiin MS/MS-analyysissä voidaan käyttää törmäyskammiona sekä ioniloukkua (trap) että siirtoväylää (transfer), joista ensimmäinen oli käytössä. Läpi päästetyt ionit tai syntyneet fragmentit analysoidaan TOF-analysaattorilla. Ionit voidaan heijastaa joko V-muodossa, jolloin saavutetaan parempi herkkyys, tai W-muodossa, jolloin resoluutio on parempi. Ionilähteenä on NanoLockSprayTM, joka mahdollistaa yhtäaikaista näytteen- ja referenssiaineen syötön kahdesta eri lähteestä.

Tässä työssä referenssivirtausta ei käytetty herkkyyden maksimoimiseksi. Kuvassa 8 on esitetty kaavakuva Synapt G2 –laitteesta.



Kuva 8. Kaavakuva Waters Synapt G2 –massaspektrometrin toimintaperiaatteesta. Kvadrupolissa valitut ionit voidaan fragmentoida joko ioniloukussa (trap) tai siirtoväylässä (transfer). TOF-analysaattorissa ionit voidaan heijastaa V-muodossa herkkyyden maksimoimiseksi tai W-muodossa resoluution maksimoimiseksi.

3.2.3. Ohjelmisto

Molempia käytössä olleita LC-MS-laitteistoja ohjattiin ja spektrinkäsittely suoritettiin tietokoneella MassLynx-ohjelmalla.

3.3. Näytteiden esikäsittely

Glykopeptidien eristys suoritettiin usean puhdistusvaiheen kautta menetelmillä, jotka on esitetty kaaviona kuvassa 9.

3.3.1. Plasman esikäsittely

Näytteenotto ja albumiinin poisto

Ihmisen veri otettiin kahteen 10 ml:n Venosafe litium-hepariiniputkeen, jäädytettiin 15 minuuttia huoneenlämpöön ja sentrifugoitiin 10 min 1200 x g huoneenlämmössä.

Plasma pipetoitiin talteen ja säilytettiin erissä -70 °C:ssa. Käytettävä plasma puhdistettiin albumiinista kaupallisen sarjan avulla (Calbiochem, Albumin Removal Kit) ja puhdistus varmistettiin SDS-PAGE:lla.

Albumiini ja IgG poistettiin HPLC-laitteistoon kiinnitetyllä HiTrap-pylväällä. Pylväs tasapainotettiin 15 ml:lla 20 mM Na-fosfaatti, 150 mM NaCl –puskuria, pH 7,4, jonka jälkeen syötettiin 150 µl:n plasmanäyte ja kerättiin 5 ml:n pesu. Albumiini ja IgG eluointiin pylvästä 100 mM glysiini-HCl –puskurilla, pH 2,7, jonka jälkeen pylväs oli käytettävissä uudelleen.

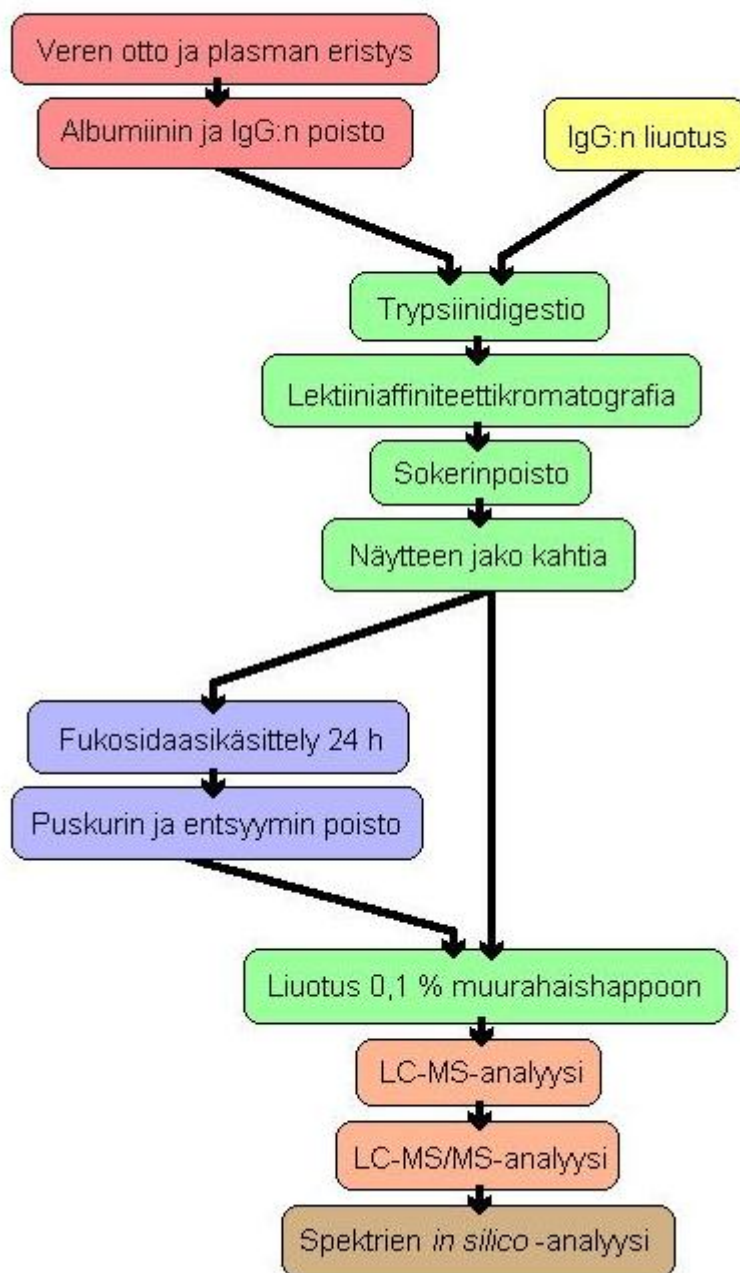
Proteiinimääritykset

Proteiinipitoisuusmääritykset eri vaiheista tehtiin BCA-sarjalla 96-kuoppalevyllä, joka kuvattiin Thermo Scientificin Multiscan* EX Microplate Photometer –laitteella. Standardeina käytettiin 25-2000 µg/ml BSA-liuoksia, jotka valmistettiin sarjan protokollan mukaan PBS:ään.

Digestointi

Trypsiinidigestiota varten proteiinit sisältävä plasmanäyte kuivattiin SpeedVac-kylmäkuivurilla pitoisuuteen 40 mg/ml. Tässä vaiheessa osa proteiineista saostui. Näyte laimennettiin ja liuotettiin 8 M urea, 133 mM Tris –puskuriin pitoisuuteen 10 mg/ml, jolloin puskurissa oli 6 M urea, 100 mM Tris. Proteiinit pelkistettiin lisäämällä 200 mM DTT:tä 100 mM:ssa Trisiä, inkuboitiin 1 h huoneenlämmössä. Alkylointi tehtiin lisäämällä 200 mM jodoasetamidia 100 mM Tris-puskurissa ja inkuboimalla 1 h huoneenlämmössä. Reagoimaton jodoasetamidi kulutettiin lisäämällä jälleen DTT:tä ja inkuboimalla kuten aiemmin. Ennen trypsiinin lisäämistä reaktioseos laimennettiin vedellä alkuperäisestä pitoisuudesta kymmenesosaan niin niin, että ureapitoisuus oli 0,6 M. Trypsiiniä lisättiin suhteessa 1:50 substraatin massaansa nähden, inkuboitiin yli yön +37 °C:ssa. Digestio pysäytettiin lisäämällä etikkahappoa, kunnes pH oli alle 6 (tarkistettiin pH-paperilla). Digestit säilytettiin -20 °C:ssa, jos ei jatkettu suoraan lektiinikromatografiaan.

Työnkulkukaavio



Kuva 9. Laboratoriotyön kulku. Plasman proteiinit ja kaupallinen IgG käsiteltiin samalla tavalla alun puhdistusvaiheiden jälkeen. Plasma- ja IgG-näytteistä tehtiin sekä defukosyloidut että koskemattomat glykaanit sisältävät näytteet.

Affiniteettikromatografia

Lektiinikromatografiaa varten pakattiin kolme pylvästä kaupallisella agarosiiin sidotulla lektiinillä: *Lens culinaris* -agglutiniini (5 ml), *Ulex europaeus* -agglutiniini I

(2 ml) ja *Aleuria aurantia* –lektiini (2 ml). Taulukossa 1 on esitetty kullekin lektiinille käytetyt suspensio- ja eluutiopuskurit.

Lektiini	<i>Aleuria aurantia</i>	<i>Ulex europaeus</i>	<i>Lens culinaris</i>
Suspensio- puskuri	10 mM HEPES, pH 7,5, 0,15 M NaCl, 10 mM fukoosi	10 mM HEPES, pH 7,5, 0,15 M NaCl, 10 mM fukoosi, 0,1 mM Ca ²⁺	10 mM HEPES, pH 7,5, 0,15 M NaCl, 0,1 mM Ca ²⁺ , 10 mM mannoosi, 0,01 mM Mn ²⁺
Eluutio- puskuri	100 mM L-fukoosi / PBS	100 mM L-fukoosi / PBS	200 mM α- metyylimannosidi, 200 mM α-metyyliglukosidi / PBS

Taulukko 1. Lektiiniaffiniteettikromatografiassa käytetyt puskurit.

Lektiinejä pestiin 20-kertaisella tilavuudella suspensiopuskuria ennen käyttöä. Peptidiliuos laimennettiin 1:5 kunkin lektiinin suspensiopuskuriin ja näyte syötettiin pylväisiin. Pylväitä pestiin 10-kertaisella tilavuudella suspensiopuskuria, ja glykopeptidit eluoiitiin 2-kertaisella tilavuudella eluutiopuskuria. Käytön jälkeen pylväitä pestiin vielä 20-kertaisella tilavuudella suspensiopuskuria.

Sokerinpoisto

Lektiinikromatografian jälkeen näytteiden monosakkaridipitoisuus oli liian korkea MS-analyysiä varten, joten sokeri poistettiin C-18 Spin Column –sentrifugisarjalla. Kolmen kolonnin sorbentit (8 mg / kolonni) yhdistettiin yhteen kolonniin. C-18-kolonnit asetettiin 2 ml Eppendorf-putkeen ja kaikki vaiheet tehtiin sentrifugoimalla 30 s, 1500 g. Kolonnit kunnostettiin 2 x 400 µl:lla 50 % ACN ja 2 x 400 µl:lla 5 % ACN, 0,1 % muurahaishappo (pesuliuos). Näytteeseen lisättiin sen tilavuudesta 1/3 4x näytepuskuria, joka sisälsi 20 % ACN, 0,4 % muurahaishappoa. Näytettä syötettiin 400 µl kerrallaan sentrifugoiden ja tyhjentäen keräysputki joka välissä. Sorbenttia pestiin 2 x 400 µl:lla pesuliuosta ja eluoiitiin uuteen putkeen 2 x 40 µl:lla 70 % ACN.

Eluaatit kuivattiin SpeedVac –kylmäkuivurilla ja pakastettiin kuivina. LC-MS-analyysiä varten näytteet liuotettiin 0,1 % muurahaishappoon.

3.3.2. IgG-malliaineen esikäsittely

62,5 nmol (10 mg) kuivaa ihmisen seerumin IgG:tä liuotettiin 312,5 µl:aan 50 mM NH_4HCO_3 -puskuria (pH 8,9) ja jaettiin 0,20 mM (32 µg/µl) liuos 30 µl:n eriin. Säilytettiin -70 °C:ssa. Trypsiinidigestio suoritettiin kuten plasmalle. Lektinikromatografiassa käytettiin ainoastaan *Lens culinaris* –agglutiniinipylvästä, ja kromatografia suoritettiin kuten plasmalle.

3.3.3. Fukosidaasikäsittelyt

Noin 2 nmol LCH-lektiinillä rikastettua IgG-glykopeptidiä tai plasman glykopeptidejä liuotettiin 60 µl:aan 140 mM Na_2PO_4 , 40 mM sitraatti –puskuria (pH 5,6). Jaettiin liuos kahtia ja lisättiin toiseen 3,3 µl naudan munuaisen α -L-fukosidaasiliuosta (1 U/ml). Inkuboitiin 24 h +37 °C:ssa. Puhdistettiin sekä fukosidaasi-käsitellyt että käsittelemättömät glykopeptidit C18 Spin –pylväällä, kuivattiin ja liuotettiin 20 µl:aan 0,1 % muurahaishappoa.

3.4. *In silico* -työvaiheet

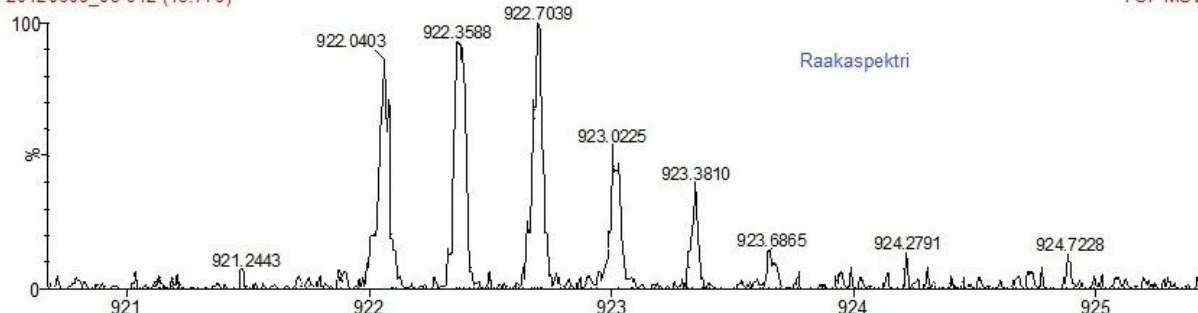
3.4.1. Spektrinkäsittely

LC-MS- ja LC-MS/MS-ajojen jälkeen otettiin hyvien MS/MS-spektrien prekursorien tarkat massat talteen. MS-spektrit käsiteltiin niin, että riittävä määrä skannauksia yhdistettiin yhdeksi spektriksi, ja MassLynxin työkaluja käyttäen spektri siloteltiin ja keskitettiin (kuva 10). Silotuksessa käytettiin Savitzky Golay –menetelmää: silotusikkunat (kanavat) ± 3 , silotuskerrat 2. Keskityksessä parametrit asetettiin niin, että piikin minimileveys puolikorkeudessa oli 4 kanavaa ja sentroidihuippu 80 %.

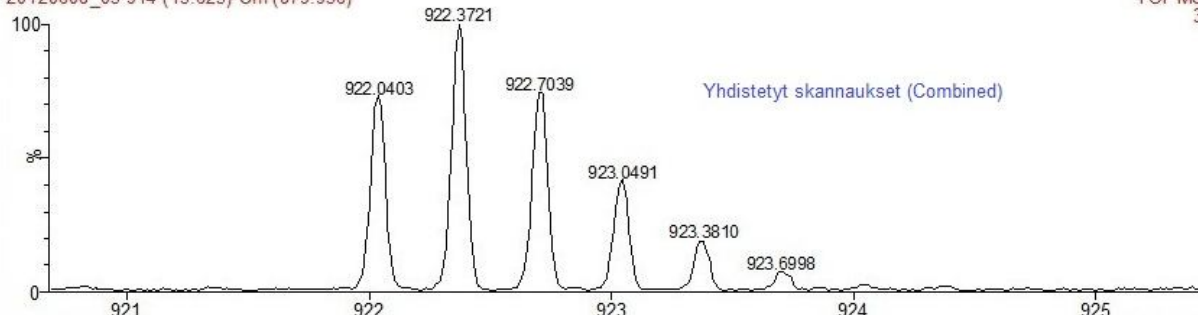
IGG_LCH_LCMS_1UL_4eV

10-Jun-2012

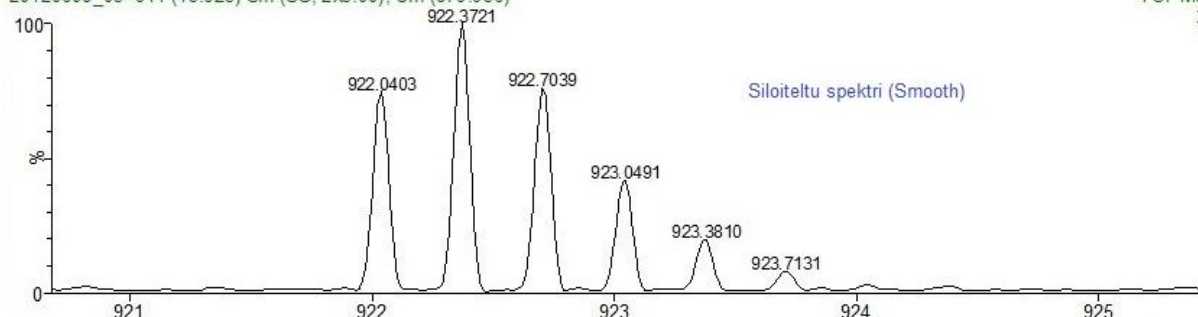
20120608_03 912 (15.776)

TOF MS ES+
758

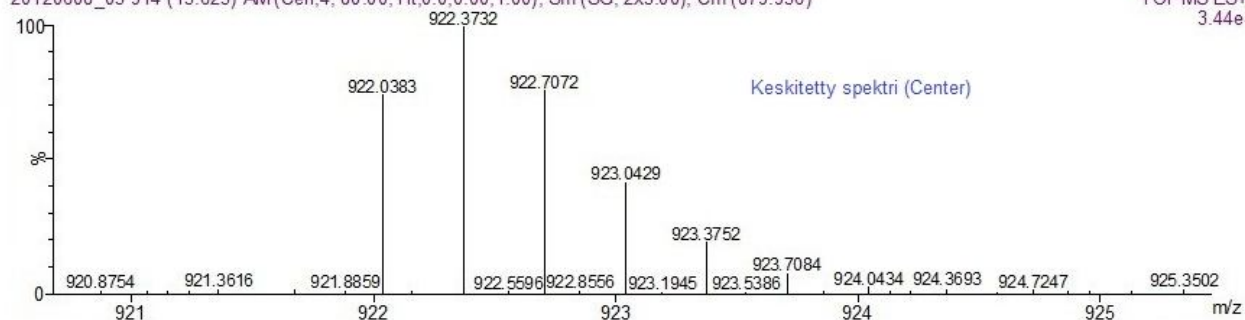
20120608_03 914 (15.623) Cm (879:936)

TOF MS ES+
3.70e4

20120608_03 914 (15.623) Sm (SG, 2x3.00); Cm (879:936)

TOF MS ES+
3.46e4

20120608_03 914 (15.623) AM(Cen,4, 80.00, Ht,0.0.0.00,1.00); Sm (SG, 2x3.00); Cm (879:936)

TOF MS ES+
3.44e4

Kuva 10. Spektinkäsittely tarkan monoisotooppisen massan kirjaamista varten. Raakaspektrit yhdistetään, silotellaan ja keskitetään.

3.4.2. Analyysi Glycopeptide ID –ohjelmalla

Tietokantojen luonti: proteolyyttisten N-glykosylaatiokohta-peptidien laskenta

Käytössä oli kolme erilaista tietokantaa: kaikki ihmisen proteiinit sisältävä SwissProt Human, plasmasta suurella varmuudella identifioituneet proteiinit sisältävä Core3020 (HUPO Human Plasma Proteome Project, PPP) sekä pienimpänä tietokantana kaikkien IgG-muotojen raskaat ketjut (taulukko 2). Teoreettiset trypsiinidigestion synnyttämät peptidit laskettiin proteiinisekvensseistä ja kaksi virhekatkaisua sallittiin peptidiä kohden. Katkaisukohdan sijainti määriteltiin arginiinin ja lysiinin jälkeiseksi seuraavan aminohapon ollessa muu kuin proliini. N-glykosylaatiokohdan NXS/T/C (X ei P) sisältävät peptidit säästettiin: näin muodostunutta peptiditietokantaa vastaan suoritettiin haut.

Tietokanta	Proteiineja	N-glykosylaatiokohdan sisältäviä proteiineja	Tryptisiä peptidejä (NXS/T/P oltava, 2 virhekatkaisua sallittu)
IgG Heavy chain Human	4	4	22
HUPO PPP Core dataset	3 020	1 425	29 440
SwissProt Human all	36 765	14 818	179 678

Taulukko 2. Käytetyt tietokannat: lopullinen analyysiin käytetty tietokanta on luotu N-glykosylaatiokohdan sisältävistä peptideistä.

Peptidien sovittaminen spektriin

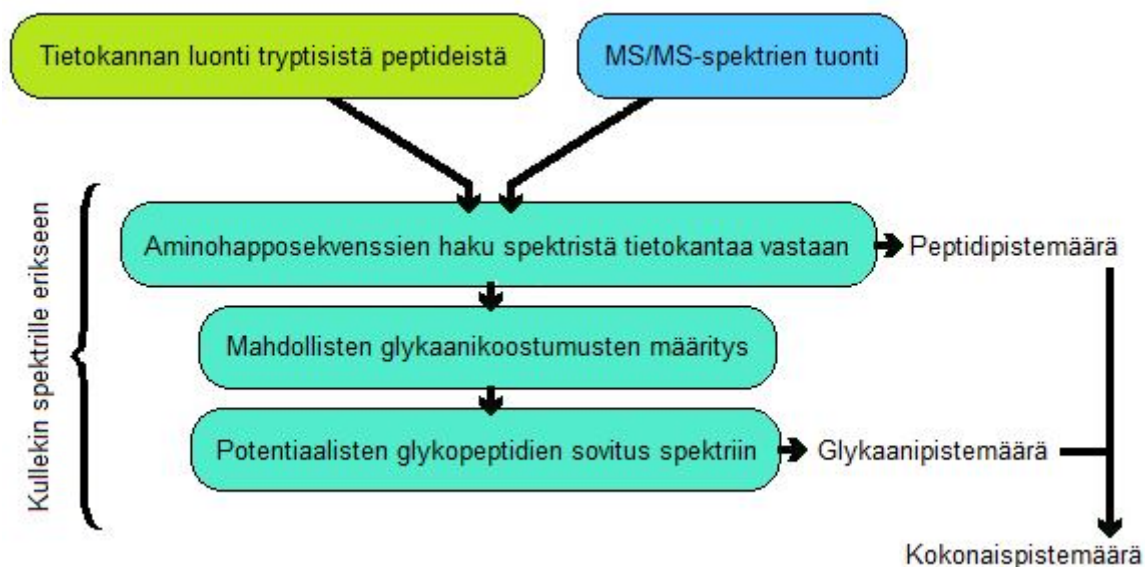
Glykopeptidispektriä verrattiin teoreettisiin peptidifragmentteihin ja listattiin parhaiten pisteytetyt peptidisekvenssit. Hakuun sisällytettiin 10, 30 tai 50 parhaiten osuvaa peptidiä, joiden massavastaavuus $\Delta m/z$ oli 30 ppm sisällä.

Glykaanien sovittaminen ja glykaanikoostumuksen ennustus

Glykaanikoostumuksen määrittämisessä käytettiin kahta iterointikierrosta. Ensin analysoitiin piikit valmiita glykaanirakenteita sisältävää GlycomeDB with N-core – tietokantaa vastaan, jossa oli 822 glykaanirakennetta.⁹⁴ Sen jälkeen luotiin *de novo* – koostumus. Tuntemattoman glykaanin massan saatiin mitattujen glykopeptidi-prekursorien ja parhaiten pisteytettyjen peptidien massaerotuksena. Luotiin lista massaan sopivista mahdollisista glykaanikoostumuksista: glykaanin koostumuksen lasketaan käytetyt monosakkaridit olivat heksoosi (Hex), N-asetyyliheksaosi (HexNAc), sialihappo (NeuAc) ja deoksiheksoosi (DeoxyHex). Rajoitukset monosakkaridien määrille olivat Hex 3-15, HexNAc 2-15, NeuAc 0-4 ja DeoxyHex 0-2. Jotkin koostumukset suodatettiin pois seuraavilla säännöillä: a) deoksiheksoosien määrä +1 on oltava vähemmän tai yhtä kuin heksoosien ja N-asetyyliheksaosi-amiinien yhteenlaskettu määrä, ja b) jos N-asetyyliheksaosi-amiineja ei ole yhtään tyvirakenteen ulkopuolella, on sialihappoja 0.

Glykopeptidikoostumusten sovittaminen spektriin

Fragmenttikirjasto luotiin glykaanikoostumuksista *in silico* –glykosidikatkaistuilla ja pisteytettiin sitä vastaan MS-analyysissä havaittujen glykopeptidien glykaanikoostumukset. Jotkin mahdottomat fragmentit suodatettiin pois, jos 1) ne eivät sisältäneet N-glykaanin tyvirakennetta, 2) sialihapot kiinnittyivät tyven HexNAc-yksiköihin tai haaran heksoosiin, tai 3) sialihappo- ja deoksiheksoositähteet olivat yhteydessä toisiinsa. Peptidirungon oletettiin pysyvän muuttumattomana ja peptidifragmenttipiikit suodatettiin pois ennen koostumuksen sovittamista. Massavastaavuuden oli oltava 40 ppm. 400 parhaan intensiteetin piikkiä valittiin sovituksen taustan vaikutuksen vähentämiseksi. Lopullinen glykopeptidin pistemäärä oli summa peptidin ja glykaanin pisteistä.



Kuva 11. *In silico* –työvaiheiden kulku Glycopeptide ID –ohjelman avulla.

Osumien suodatus

Peptidiosumien tilastollinen validointi tehtiin kohde-harhautus –menetelmällä (*engl.* target-decoy approach). Pääoletus on, että väärät positiiviset (satunnainen spektri) ovat toisistaan riippumattomia ja osuvat samalla todennäköisyydellä kohde- ja harhautustietokantaan. Harhautustietokanta luotiin kääntämällä kohdepeptidien eli N-glykosylaatiokohdan sisältävien peptidien sekvenssit väärinpäin. Peptidin tunnistus, glykaanikoostumus ja koostumuksen sovittaminen tehtiin täysin samoin kohde- ja harhautustietokantaa vastaan. Sen jälkeen verrattiin jokaisen spektrin osalta tietokantojen antamia pistemääriä. Käytetty pisteparametri oli korkeimmalle rankatun peptidin pistemäärä glykopeptidin sovittamisen pisteytysvaiheen jälkeen. Kun oletetaan kokeiden olevan toisistaan riippumattomia, voidaan väärin positiivisten osumien määrä kohdetietokantaan arvioida osumien määrästä harhautustietokantaan kääntämällä binomiaalinen jakauma ympäri. Tulosten pisteraja valittiin niin, että keskimäärin 90 % osumista kohdetietokantaan on oikeita positiivisia; tähän määritykseen on aiemmin käytetty serotransferriinia malliaineena.⁹⁵

Pisteytysmenetelmä

Pistemäärä teoreettiselle glykopeptidille G on laskettu negatiivisena logaritmina siitä todennäköisyydestä, että satunnainen sarja fragmentteja sisältäisi yhtä paljon tai enemmän yhteisiä piikkejä mitatun spektrin ja rankatun glykopeptidin kanssa.

S on mitattu spektri, jossa on M massa-arvoa $\{m_1 \dots m_M\}$ yhteensä M_p :stä mahdollisesta annetulla massa-alueella ja toleranssilla (tol). G on teoreettinen glykopeptidispektri N :llä massa-arvolla $\{g_1 \dots g_N\}$ ja R on satunnainen spektri N :llä massa-arvolla valittuna mitatun spektrin massa-alueelta. Yhteinen piikkiluku (shared peak count) $SPC(G, S)$ on määritelty sellaisten piikkiparien määränä G :ssä ja S :ssä, joissa $|g_i - m_j| < tol$, kun $i \in \{1 \dots N\}$ ja $j \in \{1 \dots M\}$. Todennäköisyys P_R sille, että satunnainen spektri R sisältää yhtä paljon tai enemmän yhteisiä piikkejä kuin glykopeptidispektri G , $SPC(R, S) \geq SPC(G, S)$, lasketaan käyttämällä binomiaalista jakaumaa

$$P_R = 1 - \sum_{k=0}^{Nh-1} \binom{N}{k} p^k (1-p)^{N-k}, \text{ jossa}$$

$$Nh = SPC(G, S) \text{ ja } p = \frac{M}{M_p}$$

Lopuksi pistemäärät annetaan muodossa $Score(G, S) = -\log(P_R)$.

Kuvassa 11 on esitetty *in silico* -työvaiheet kaavamaisesti.

4. TULOKSET

Huomioitavaa on, että tästä eteenpäin käytetään kolmikirjaimisten monosakkaridi-lyhenteiden sijaan tai lisäksi yhden kirjaimen lyhenteitä. H = Hex (heksoosi), N = HexNAc (N-asetyyliheksoosiamiini), F = Fuc (fukoosi) ja S = Sia (sialihappo).

4.1. Malliaineen ja defukosyloidun malliaineen analyysi

IgG:n MS/MS-spektrit analysoitiin kaikkia kolmea tietokantaa vastaan tulosten luotettavuuden arvioimiseksi. Kaksi ensimmäistä (parhaan kokonaispistemäärän) osumaa olivat kaikissa tietokannoissa samat, kun parhaan peptidipistemäärän osumia valittiin 100 jatkoon: IgG2 glykaanikoostumuksella H4N4F1 ja IgG3 glykaani-

koostumuksella H3N4F2. Seuraavissa osumissa oli eroja, mutta IgG2 glykaanikoostumuksella H5N4F1 on löytyi myös Core3020-tietokanta-ajossa sijalta 8. 10 parhaan kokonaispistemäärän osumaa on esitetty taulukossa 3 kutakin tietokantaa vastaan analysoituna.

Analyysissä Glycopeptide ID tarjoaa useita vaihtoehtoja kullekin prekursorille, ja kullekin annetaan sijoitus (ranking) peptidipistemäärän, glykaanipistemäärän tai kokonaispistemäärän mukaan. Taulukossa 3 on siis esitetty kunkin prekursorin kokonaispistemäärältään paras osuma, rank 1. Taulukossa 4 on avattu yhden prekursorin analyysin tarjoamat vaihtoehdot: tässä tapauksessa jatkoon pääsevien peptidien määräksi on valittu 10, ja kunkin peptidiosuman peptidipistemäärä, glykaanipistemäärä, kokonaispistemäärä, sijoitus sekä muita osuman luotettavuuden kannalta oleellisia arvoja on taulukoitu.

Kuvassa 12 on esitelty näytteen antama tyypillinen kromatogrammi ja massaspektri, ja kuva 13 esittää Glycopeptide ID –ohjelman tarjoamaa annotaatiota yhdestä (tässä tapauksessa ionin m/z 922) spektristä.

Malliaineen analyysin tulokset**Tietokanta: IgG Heavy chain**

m/z	z	$\Delta m/z$	Pep. score	Glyc. score	Total score	Composition	Protein	Sequence
922	3	0,00757	61,27	309,64	371	H4N4F1	IGHG2_HUMAN	EEQFNSTFR
922	3	-0,01249	42,6	303,6	346	H3N4F2	IGHG3_HUMAN	EEQYNSTFR
1073	3	0,01047	11,07	322,12	333	S1H5N4F1	IGHG2_HUMAN	EEQFNSTFR
1287	3	-0,02103	11,21	311,41	323	S2H5N5F2	IGHG2_HUMAN	EEQFNSTFR
853	4	0,009495	40,68	245,27	286	H5N4F1	IGHG2_HUMAN	TKPREEQFNSTFR
976	3	0,00617	16,83	253,19	270	H5N4F1	IGHG2_HUMAN	EEQFNSTFR
1019	3	0,00557	11,06	219,18	230	S1H4N4F1	IGHG2_HUMAN	EEQFNSTFR
812	4	0,009695	16,61	197,97	215	H4N4F1	IGHG2_HUMAN	TKPREEQFNSTFR
863	4	0,001345	16,51	186,64	203	H4N5F1	IGHG2_HUMAN	TKPREEQFNSTFR
1102	4	-0,01695	10,99	127,72	139	S1H3N9F1	IGHG4_HUMAN	TKPREEQFNSTYR

Tietokanta: HPP Core3020

m/z	z	$\Delta m/z$	Pep. score	Glyc. score	Total score	Composition	Protein	Sequence
922	3	0,00757	61,27	309,64	371	H4N4F1	IGHG2_HUMAN	EEQFNSTFR
922	3	-0,01249	42,6	303,6	346	H3N4F2	IGHG3_HUMAN	EEQYNSTFR
1334	3	0,003003	23,18	313,93	337	S3H5N5F1	SEPP1_HUMAN	CGNCSLTTLK
1134	4	0,00017	22,49	310,1	333	S1H5N5F4	ZFH4_HUMAN	SLGGHMTMMHSRNSCK
1069	4	0,01102	23,29	306,45	330	S4H5N4F1	LAMB1_HUMAN	LSDTTSQSNSTAK
1252	3	0,014203	28,58	288,67	317	S2H5N4F1	HEMO_HUMAN	SWPAVGNCSSALR
1180	4	0,01562	28,07	278,81	307	S2H5N5F2	PPM1G_HUMAN	NAGGKVTMDGRVNGGLNLSR
853	4	0,009495	40,68	245,27	286	H5N4F1	IGHG2_HUMAN	TKPREEQFNSTFR
1217	4	-0,01990	28,81	253,16	282	S2H4N9F2	K0586_HUMAN	RLPVGTTGSLNGTSR
1073	3	0,020603	22,64	252,94	276	S1H5N3F1	CELR3_HUMAN	NGSHARCRCR

Tietokanta: SwissProt Human

m/z	z	$\Delta m/z$	Pep. score	Glyc. score	Total score	Composition	Protein	Sequence
922	3	0,00757	61,27	309,64	371	H4N4F1	IGHG2_HUMAN	EEQFNSTFR
922	3	-0,01249	42,6	303,6	346	H3N4F2	IGHG3_HUMAN	EEQYNSTFR
1425	3	0,023703	28,97	309,59	339	S3H4N5F2	LCN8_HUMAN	VAYNSSGSCEIEK
1217	4	-0,01555	39,93	270,81	311	S2H5N4F1	ZNF79_HUMAN	AFSOSANLTNHQRTHTGEKPYK
1073	4	0,006495	33,84	222,21	256	S2H5N3F1	TF7L1_HUMAN	SSLVNESENQSSSDSEAER
1134	4	-0,00355	34,12	218,26	252	S2H5N3F1	CLC5A_HUMAN	CFFLSTSESSWNESRDFCK
1180	4	0,009545	33,81	215,42	249	S2H5N4F1	FETUA_HUMAN	AALAAFNAQNNGSNFQLEEISR
1287	3	0,00737	34,56	180,27	215	S2H6N3	S1PR3_HUMAN	GNETLREHYQYVGK
1002	4	-0,00805	33,92	179,58	214	S1H3N3F3	F200B_HUMAN	LLEVTTNNGAVWNHCFIHR
1431	3	0,027603	23,1	185,97	209	S2H5N4F1	TBC8B_HUMAN	EFSSAIDIMYNGSFTEK

Taulukko 3. IgG-malliaineen Glycopeptide ID –analyysin tulokset kussakin tietokannassa. Kaksi parasta osumaa eivät ole tässä sama prekursori, vaan ensimmäisen tarkka massa on 922,0366 ja toisen 922,0537.

m/z	z	Protein	Peptide mass	N_site	Sequence	dmz	Rank_peptide	Score_peptide	Hits_peptide	b	y	Composition	ppm	Rank_glycan	Score_glycan	Hits_glycan	Rank_all	Score_all	Hits_all	I_all
922,0336	3	IGHG2_HUMAN	1156,515	176	EEQFNSTFR	0,0076	1	61,27	10	3,5	1,4,2,3,7,6	H4N4F1	8,21011	1	309,64	64	1	370,9	74	0,54
922,0336	3	IGHG3_HUMAN	1172,51	227	EEQYNSTFR	0,0076	3	35,24	6	3,8	1,4,2,3	H3N4F2	8,24626	2	309,22	60	2	344,4	66	0,44
922,0336	3	IGHG4_HUMAN	1172,51	177	EEQFNSTYR	0,0076	5	22,85	4	3,8,5	1	H3N4F2	8,24626	3	309,22	60	3	332,0	64	0,43
922,0336	3	IGHG3_HUMAN	1654,806	227	TKPREEQYNSTFR	370,431	6	22,12	4		1,4,2,3		401755							
922,0336	3	IGHG2_HUMAN	1638,811	176	TKPREEQFNSTFR	375,763	2	40,21	7		9,1,4,2,3,7,6		407537							
922,0336	3	IGHG2_HUMAN	3351,689	176	EEQFNSTFRVVSVLTVVH QDWLNGKEYK	-195,19	10	15,25	3	9,3,5										
922,0336	3	IGHG3_HUMAN	3052,479	227	WYVDGVEVHNAKTKPRE EQYNSTFR	-95,459	4	26,5	5	2	1,4,2,3									
922,0336	3	IGHG_HUMAN	2961,498	177	EEQFNSTYRVVSVLTVLH QDWLNGK	-65,132	7	20,9	4	3,21,8,5										
922,0336	3	IGHG4_HUMAN	3381,699	177	EEQFNSTYRVVSVLTVLH QDWLNGKEYK	-205,19	8	20,69	4	3,21,8,5										
922,0336	3	IGHG2_HUMAN	2931,488	176	EEQFNSTFRVVSVLTVVH QDWLNGK	-55,129	9	15,4	3	9,3,5										

Taulukko 4. Prekursorin 922,0336 vaihtoehdot Glycopeptide ID -analyysissä, kun rajaksi on asetettu 10 parasta peptidipistemäärää. Osumat on järjestetty parhaan kokonaissijoituksen/-pistemäärän (Rank_all / Score_all) mukaan. Huomioitavaa on, ettei peptidisijoitus (Rank_peptide) välttämättä noudata samaa järjestystä. Tässä tapauksessa massaerot (dmz) neljänneistä osumasta eteenpäin ovat huomattavan suuria, eikä näille osumille ole saatu sovitettua lainkaan glykaania. Siksi niiltä puuttuu glykaanikompositio, -pistemäärä ja -sijoitus. Sarakkeet b ja y kuvaavat b- ja y-ionien löytymistä: esimerkiksi parhaaksi sijoitetulle osumalle on löytynyt ionit b3, b5, y1, y2, y3, y4, y7, ja y6. Samalla nähdään, että huonommin sijoittuneille osumille ei ole välttämättä löytynyt yhtään y-iona, mikä myös heikentää näiden osumien arvoa, sillä y-ionien puuttuminen on epätyypillistä tryptisille peptideille. Sarakkeet Hits_peptide, Hits_glycan ja Hits_all kuvaavat osumien määrää spektriin peptidien, glykaanien ja niiden summan osalta. I_all kuvaa selitettyä kokonaisintensiteettiä: esimerkiksi parhaaksi sijoitetun osuman avulla voidaan spektristä selittää 54 % (jolloin 46 % jää selittämättömäksi).

IGG_LCH_LCMS_1UL_4eV

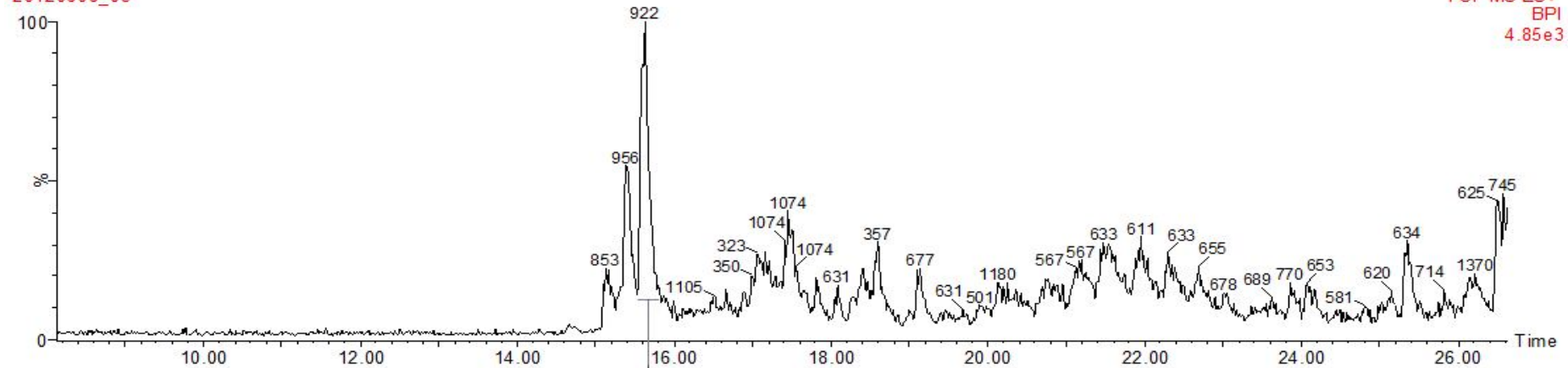
20120608_03

10-Jun-2012

TOF MS ES+

BPI

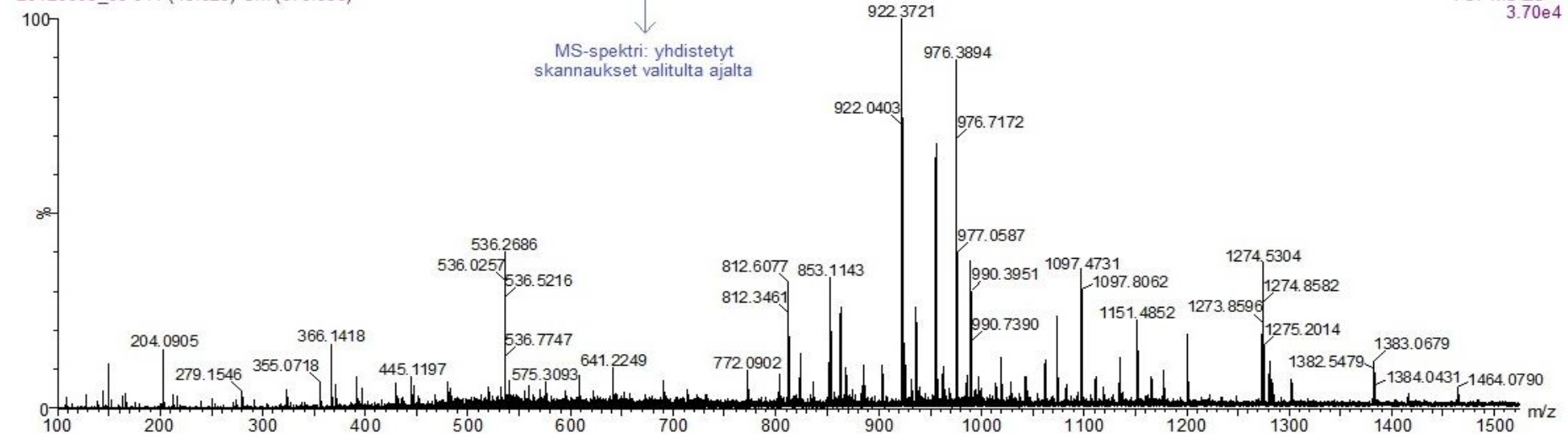
4.85e3



20120608_03 914 (15.623) Cm (878:936)

TOF MS ES+

3.70e4



Kuva 12. Esimerkki IgG-näytteen LC-MS-kromatogrammista ja MS-spektristä. Kromatogrammista on valittu piikki, jonka skannaukset yhdistämällä on saatu yhdistetty massaspektri. Spektrissä näkyy m/z -alueella 800-1500 useita eri glykopeptidejä, joiden retentioaika on sama. Näitä ovat esimerkiksi piikit 812, 853, 922, 976, 1097 ja 1274. Näytteen ollessa puhdasta IgG:tä johtuvat massaerot pääasiassa glykaanien variaatiosta; lisäksi sama glykopeptidi voidaan nähdä eri varauksilla eri m/z -arvoilla. Glykopeptideille karakteriset ionit 204 ja 366 ovat myös näkyvissä.

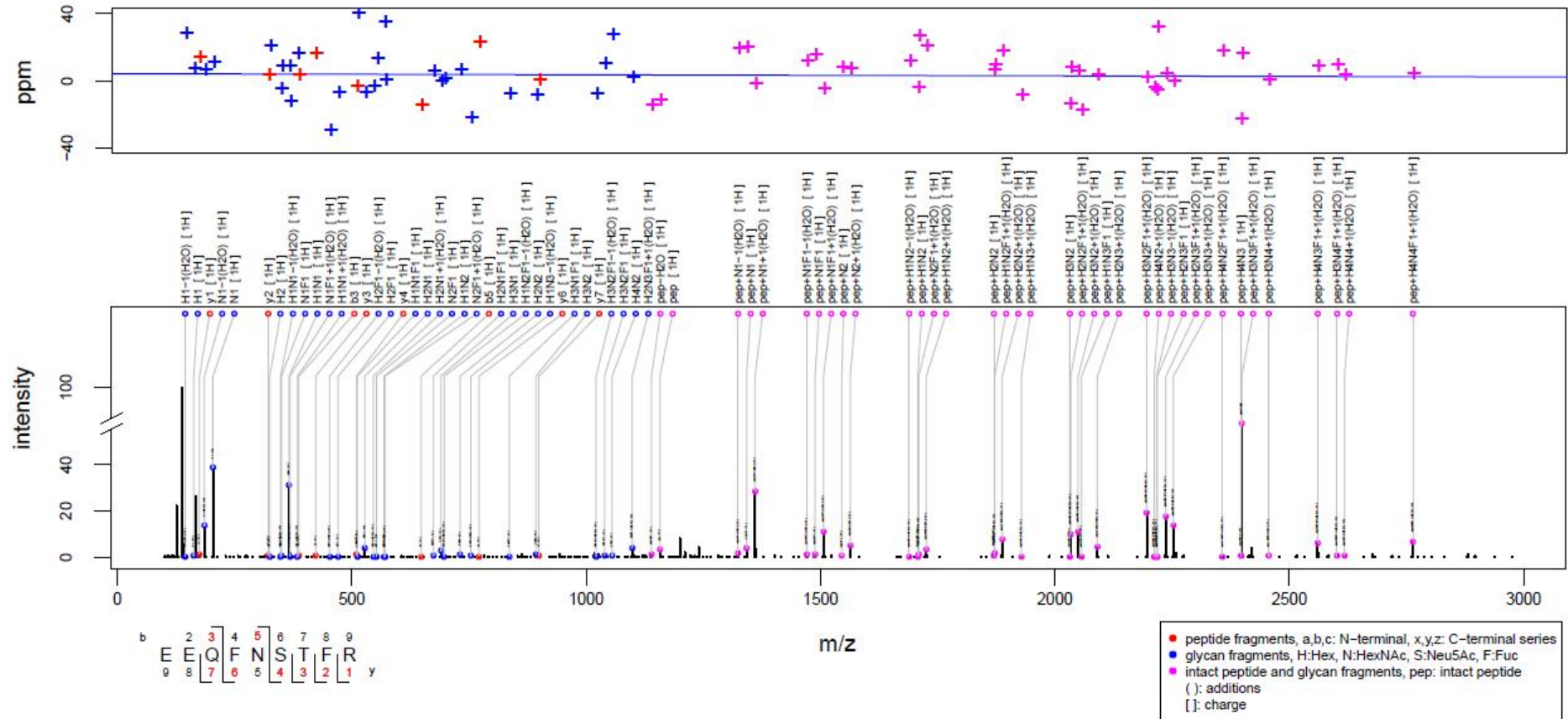
m/z 922.0336 charge 3 scan 0-0

Score= 370.91 , Hits= 74 , Explained Intensity= 0.54

Peptide: sp|P01859|IGHG2_HUMAN[172,180]:EEQFNSTFR

Glycan: H4N4F1

Charge: 3H



Kuva 13. Glycopeptide ID –ohjelman analyysi prekursorin 922 MS/MS-spektristä. Ylemmässä laatikossa on esitetty kunkin piikin massan erotus laskennalliseen massaan. Alemmassa laatikossa on selitykset tunnistetuille piikeille. Sekvenssiin EEQFNSTFR on päädytty kuuden y-ionin ja kahden b-ionin avulla – peräkkäisten y-ionien löytyminen lisää tuloksen luotettavuutta. Suuremmilla m/z-arvoilla näkyviin peptidi+glykaanipiikkeihin on sovitettu täydellinen monosakkaridisarja, johon sopii glykaanikoostumus H4N4F1 (4*Hex, 4*HexNAc, 1*Fuc).

4.2. Plasmanäytteestä identifioidut tyvifukosyloidut glykopeptidit

UEA- ja AAL-lektiineillä ei onnistuttu rikastamaan riittävästi glykopeptidejä hyvien MS-spektrien saamiseksi. Sen sijaan LCA-lektiini toimi hyvin glykopeptidien rikastuksessa, ja eluaatista saatiin runsaasti lupaavia glykopeptidien MS- ja MS/MS-spektrejä.

Glykopeptide ID identifioi plasmanäytteestä useita yleisiä glykoproteiineja. IgG:n poistosta huolimatta myös se tunnistettiin, sillä IgG:n ollessa plasman ylivoimaisesti yleisin tyvifukosyloitu glykoproteiini jää sitä puhdistuksen jälkeenkin näytteeseen. Taulukoissa 4 ja 5 on esitetty kunkin prekursorin paras ranking-tulos vastaavaksi proteiiniksi ja glykaanikompositioksi, kun spektrit on ajettu joko Core3020- tai SwissProt Human –tietokantoja vastaan.

Tyypillinen kromatogrammi ja massaspektri plasmanäytteen LC-MS-ajosta on esitelty kuvassa 14 ja annotaatio ionista m/z 1180 kuvassa 15.

m/z	z	$\Delta m/z$	Pep. score	Glyc. score	Total score	Composition	Protein	Sequence
1180	4	0,01437	112,91	304,71	418	S2H5N4F1	FETUA_HUMAN	AALAAFNAQNNGSNFQLEEISR
1217	4	0,01384	90,87	318,03	409	S2H5N4F1	TRFE_HUMAN	QQQHLFGSNVTDCSGNFCLFR
922	3	0,00717	62,7	311,59	374	H4N4F1	IGHG2_HUMAN	EEQFNSTFR
976	3	0,00357	62,74	310,1	373	H5N4F1	IGHG2_HUMAN	EEQFNSTFR
873	3	0,007736	55,52	314,36	370	H3N4F1	IGHG4_HUMAN	EEQFNSTYR
956	4	0,007595	41,59	321,42	363	S2H5N4F1	APOH_HUMAN	VYKPSAGNNSLYR
1180	4	0,006845	111,48	242,25	354	S2H5N4F1	FETUA_HUMAN	AALAAFNAQNNGSNFQLEEISR
1252	3	0,012103	41,01	311,98	353	S2H5N4F1	HEMO_HUMAN	SWPAVGNCSSALR
1180	4	-0,00795	77,41	271,7	349	S2H5N4F1	FETUA_HUMAN	AALAAFNAQNNGSNFQLEEISR
1062	4	0,01227	41,03	306,67	348	S2H5N4F1	CERU_HUMAN	EHEGAIYPDNTTDFQR
1274	3	0,00727	34,78	309,98	345	S2H5N4F1	APOH_HUMAN	VYKPSAGNNSLYR
812	4	0,01099	48,12	256,9	305	H4N4F1	IGHG2_HUMAN	TKPREEQFNSTFR
1062	4	0,00637	53,13	246,86	300	S2H5N4F1	CERU_HUMAN	EHEGAIYPDNTTDFQR
1144	4	0,01149	33,84	250,6	284	S1H5N4F1	TRFE_HUMAN	QQQHLFGSNVTDCSGNFCLFR
998	4	0,01419	40,83	239,04	280	S2H5N4F1	CERU_HUMAN	AGLOAFFQVQECNK
1573	3	0,00753	34,04	219,78	254	S2H5N4F1	FETUA_HUMAN	AALAAFNAQNNGSNFQLEEISR
1623	3	0,02237	24,08	225,59	250	S3H5N6F3	VP13A_HUMAN	VEYN TSAHQSSFR
1189	4	0,02099	27,76	213,76	242	S2H5N3F1	NEBU_HUMAN	DLELEVKGRLNAMANETPDFMR
1062	4	0,00027	46,86	191,02	238	S2H5N4F1	CERU_HUMAN	EHEGAIYPDNTTDFQR
861	4	0,01159	40,69	192,11	233	H5N4F1	IGHG1_HUMAN	TKPREEQYNSTYR
1269	4	0,02254	27,64	194,45	222	S2H5N4F1	APOD_HUMAN	ADGTVNQIEGEATPVNLTEPAKLEVK
1447	4	-0,0146	16,56	201,63	218	S1H8N7F2	MYO6_HUMAN	YAE LRDTINTSCDIELLAACR
1230	4	0,00874	27,66	170,15	198	S2H4N5F1	Q9Y607_HUMAN	GSTSGSRAPSEYSGHLNSSSRASSR
1179	4	-0,0106	27,65	160,32	188	S1H6N3F2	PTPRG_HUMAN	SGVTHAAEERNQTEPSTPSSPNR
1104	4	0,0152	34,24	148,99	183	H5N5F2	MUCB_HUMAN	GLTFQQNASSMCGPDQDTAIR
1183	4	-0,0043	27,4	130,72	158	S1H4N2F2	PGM5_HUMAN	FFSNLMDSGRCNLCGEESFGTGS DHLR
1180	4	-0,01995	39,71	111,25	151	S2H5N3	PARI_HUMAN	SPTQVNN SIKPLRERICVSMQEK
1228	4	-0,01408	27,8	122,52	150	S3H3N2F2	PKHA8_HUMAN	NHDNNLTQSGSDSSCSPECLWEEGK
1573	3	0,02320	52	90,27	142	H12N2	FETUA_HUMAN	AALAAFNAQNNGSNFQLEEISR
1073	4	0,01394	33,82	105,92	140	S3H3N2F1	SI1L1_HUMAN	SSDLEDNRSEDSVRPWTC PK

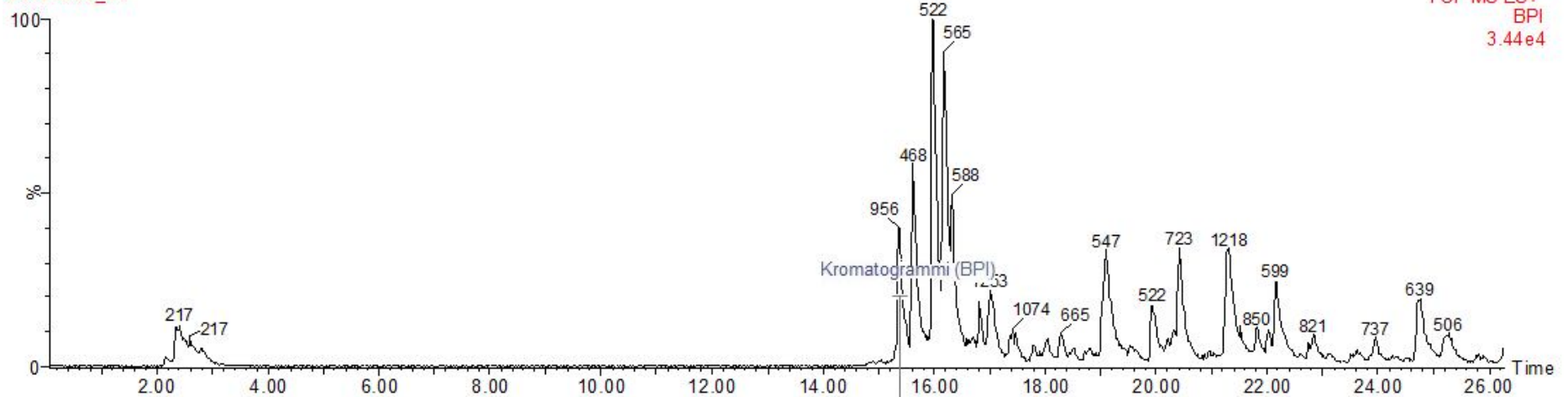
Taulukko 5. Plasman glykopeptidien Glycopeptide ID –analyysin tulokset, kun spektrit on ajettu Core3020-tietokantaa vastaan.

m/z	z	$\Delta m/z$	Pep. score	Glyc. score	Total score	Composition	Protein	Sequence
1180	4	0,01437	112,91	304,71	418	S2H5N4F1	FETUA_HUMAN	AALAAFNAQNNGSNFQLEEISR
1217	4	0,01384	90,87	318,03	409	S2H5N4F1	TRFE_HUMAN	QQQHLFGSNVTDCSGNFCLFR
922	3	0,00717	62,7	311,59	374	H4N4F1	IGHG2_HUMAN	EEQFNSTFR
976	3	0,00357	62,74	310,1	373	H5N4F1	IGHG2_HUMAN	EEQFNSTFR
873	3	0,00773	55,52	314,36	370	H3N4F1	IGHG4_HUMAN	EEQFNSTYR
1573	3	-0,0214	40,83	323,34	364	S2H5N5F3	CI139_HUMAN	GFCPEMGQNESLSEER
956	4	0,00759	41,59	321,42	363	S2H5N4F1	APOH_HUMAN	VYKPSAGNNSLYR
1180	4	0,00684	111,48	242,25	354	S2H5N4F1	FETUA_HUMAN	AALAAFNAQNNGSNFQLEEISR
1252	3	0,01210	41,01	311,98	353	S2H5N4F1	HEMO_HUMAN	SWPAVGNCSSALR
1180	4	-0,0079	77,41	271,7	349	S2H5N4F1	FETUA_HUMAN	AALAAFNAQNNGSNFQLEEISR
1062	4	0,01227	41,03	306,67	348	S2H5N4F1	CERU_HUMAN	EHEGAIYPDNTTDFQR
1116	5	0,00979	27,91	317,13	345	S1H5N5F4	TEN3_HUMAN	EEDVSITSNLSSIDSFYTMVQDQLR
1425	3	0,02433	29,07	309,54	339	S2H6N6F2	GRDN_HUMAN	TTVDSVEGNASK
1598	5	-0,0290	16,42	308,46	325	S3H10N8F2	BICD1_HUMAN	GESLNPVSDLFSELNISEIQKLKQQLMOVER
1062	4	0,00637	53,13	246,86	300	S2H5N4F1	CERU_HUMAN	EHEGAIYPDNTTDFQR
1144	4	0,01149	33,84	250,6	284	S1H5N4F1	TRFE_HUMAN	QQQHLFGSNVTDCSGNFCLFR
998	4	0,01419	40,83	239,04	280	S2H5N4F1	CERU_HUMAN	AGLQAFFQVQECNK
1447	4	-0,0287	28,68	243,4	272	S2H8N6F2	Z585B_HUMAN	CNECGKSFQVSSSLFRHHR
1224	4	0,01797	28,16	239,18	267	S2H5N4F3	GDF5O_HUMAN	KSFQMSNTSQPDSPRPGTER
1228	4	0,00222	28,85	235,24	264	H6N9F3	CUL4B_HUMAN	KLNSSSSSSNSSNER
1573	3	0,00753	34,04	219,78	254	S2H5N4F1	FETUA_HUMAN	AALAAFNAQNNGSNFQLEEISR
1062	4	0,00027	46,86	191,02	238	S2H5N4F1	CERU_HUMAN	EHEGAIYPDNTTDFQR
861	4	0,01159	40,69	192,11	233	H5N4F1	IGHG1_HUMAN	TKPREEQYNSTYR
1197	4	-0,0105	33,6	189,38	223	S1H4N4F2	FAM5C_HUMAN	IKSNGPNGNESIYYEPLFIDPSR
1269	4	0,02254	27,64	194,45	222	S2H5N4F1	APOD_HUMAN	ADGTVNQIEGEATPVNLTEPAKLEVK
1146	4	0,02167	28,52	189,5	218	S1H6N5F2	CQ077_HUMAN	YSVCKKVCNFCACGK
1069	4	0,02222	40,61	173,63	214	S2H6N2F2	IKZF2_HUMAN	FSYPDIHFDMLNLTYEK
1269	4	0,01487	27,55	176,5	204	S1H6N3F2	MEPCE_HUMAN	DITDPLSLNTCTDEGHVVLASPLKTGR
1155	4	0,00253	34,3	165,18	199	S1H5N3F1	CRLD2_HUMAN	NGRPCSECPPSYGGSCRNNLCYR
1185	4	-0,0008	33,8	164,51	198	S1H5N4F2	RASA2_HUMAN	TDSSHQAWYLLQPRDNGNKSSK

Taulukko 6. Plasman glykopeptidien Glycopeptide ID –analyysin tulokset, kun spektrit on ajettu SwissProt Human-tietokantaa vastaan.

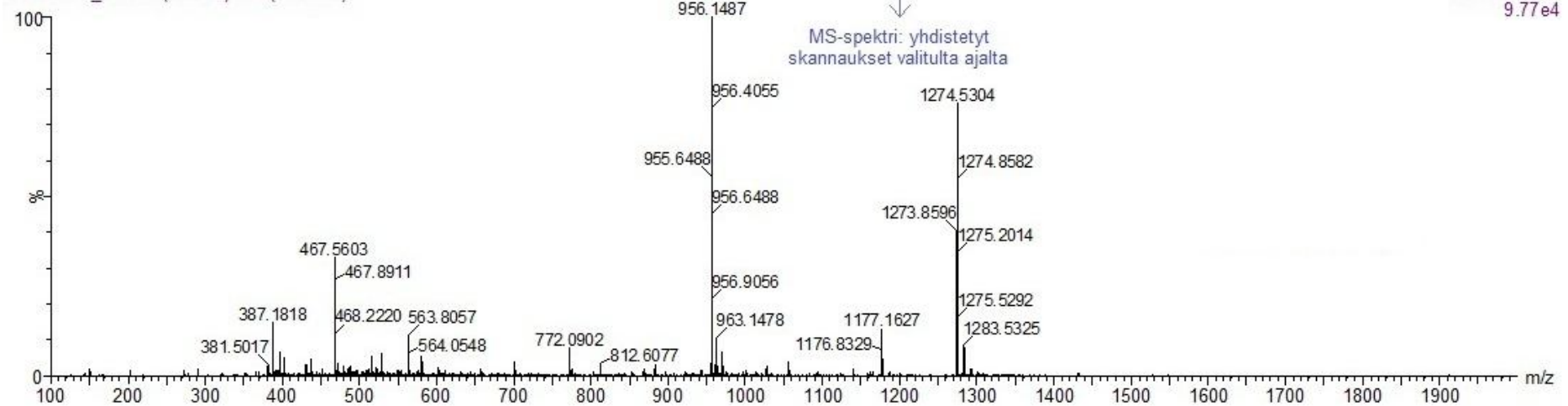
PLASMA_LCH_LCMS_1UL_4eV
20120608_01

10-Jun-2012
TOF MS ES+
BPI
3.44e4

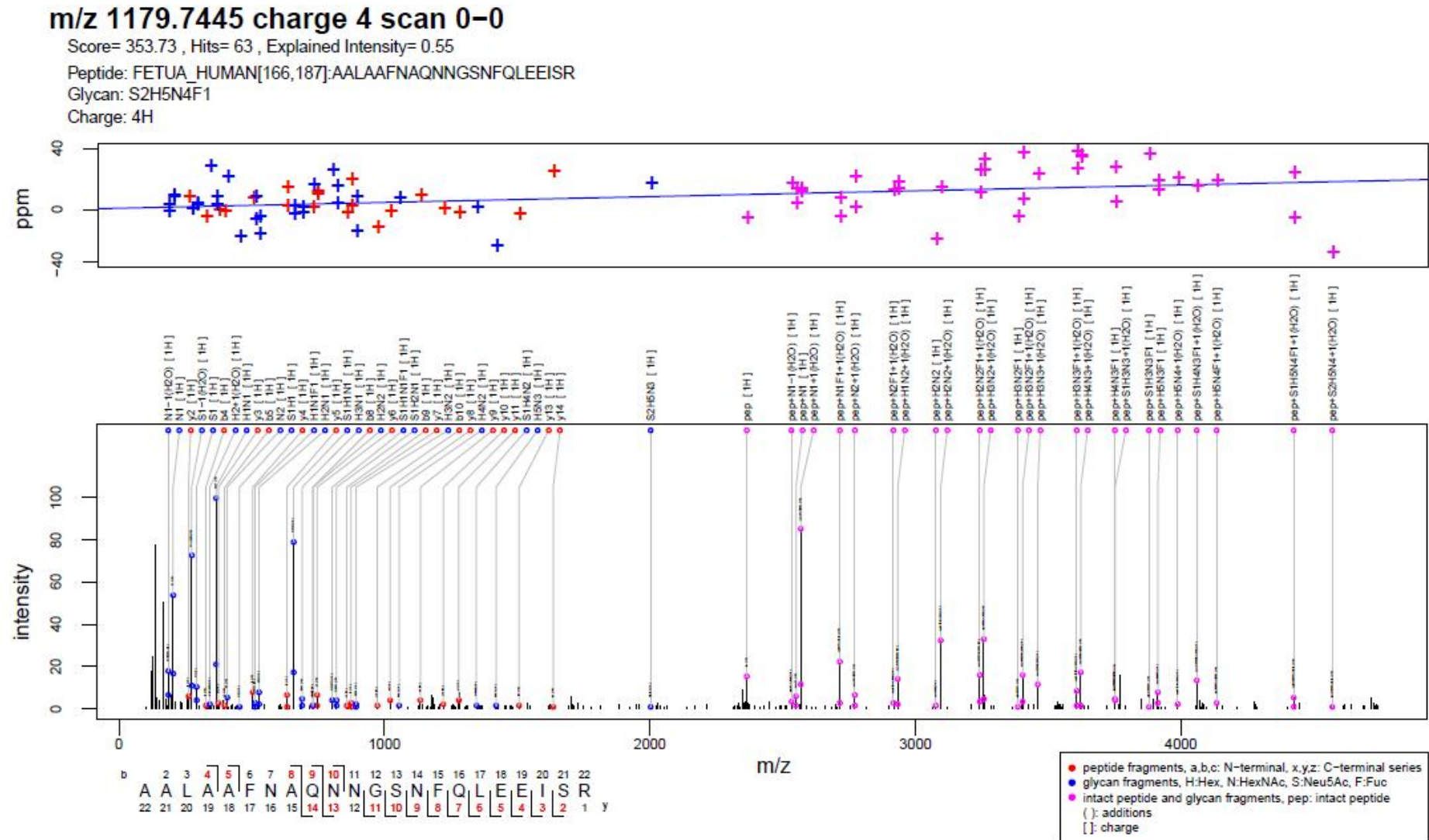


PLASMA_LCH_LCMS_1UL_4eV
20120608_01 899 (15.366) Cm (890:913)

10-Jun-2012
TOF MS ES+
9.77e4



Kuva 14. Esimerkki plasmanäytteen kromatogrammista ja massaspektristä.



Kuva 15. Glycopeptide ID -ohjelman analyysi prekursorin 1180 MS/MS-spektristä. Peptidistä on saatu erittäin hyvä y-sarja ja tyydyttävä b-sarja. Aminohapposekvenssi selittää osaltaan b-sarjan epätäydellisyys: neutraali AALAA-sekvenssi ei helposti protonoidu, joten varaus jää todennäköisemmin karboksyyliipäähän. Tietokannasta löytyi tätä sekvenssiä vastaavaksi proteiiniksi fetuiini A.

Tyvirakenteen fukosyloituja palasia pep+N1F1, pep+N2F1, pep+H1N2F1, pep+H2N2F1 ja pep+H3N2F1 löytyi, usein yhden H₂O-molekyylin poistumalla tai lisäyksellä, kaikista identifioitujen fukosyloitujen proteiinien spektreistä useita (taulukko 7).

Precursor	Protein (top hit)	pep		pep+N1		pep+N1F1		pep+N2F1		pep+H1N2F1		pep+H2N2F1		pep+H3N2F1	
		+ H ₂ O	- H ₂ O	+ H ₂ O	- H ₂ O	+ H ₂ O	- H ₂ O	+ H ₂ O	- H ₂ O	+ H ₂ O	- H ₂ O	+ H ₂ O	- H ₂ O	+ H ₂ O	- H ₂ O
1179,7370	FETUA_HUMAN	X		X	X	X		X				X			X
1217,2365	TRFE_HUMAN	X		X		X	X	X		X	X	X		X	
922,0340	IGHG2_HUMAN	X		X	X	X	X	X	X	X	X		X	X	X
976,0552	IGHG2_HUMAN	X		X	X	X	X	X	X			X			
873,3475	IGHG4_HUMAN	X		X	X	X	X	X	X			X	X		X
955,6440	APOH_HUMAN	X			X	X	X	X	X			X	X	X	X
1179,7368	FETUA_HUMAN	X			X	X	X	X				X	X		X
1252,4966	HEMO_HUMAN				X	X	X	X	X			X			X
1061,6610	CERU_HUMAN	X			X	X	X	X	X			X		X	X
998,3994	CERU_HUMAN	X		X		X	X							X	X
1572,6585	FETUA_HUMAN	X		X		X		X						X	

Taulukko 7. Eräiden Glycopeptide ID:n identifioimien, tyvifukoosin sisältävien glykopeptidiosumien spektreistä löytyneet tyvirakennefragmentit. Monesti voidaan nähdä itse fragmentin sijasta tai sen lisäksi fragmentti+H₂O tai fragmentti-H₂O. Peptidi+HexNAc-piikki löytyy useimmiten, sillä peptidin ja HexNAc:in välinen amidisidos on kohtalaisen stabiili. Täydellinen fukoosisarja näkyy kaikilla näillä glykopeptideillä lukuunottamatta prekursoreita 976, 1180, 998 ja 1573, joissa yksi tai useampi piikki puuttuu. Prekursorilta 1252 ei puolestaan ole löytynyt pelkän peptidin osoittavaa piikkiä.

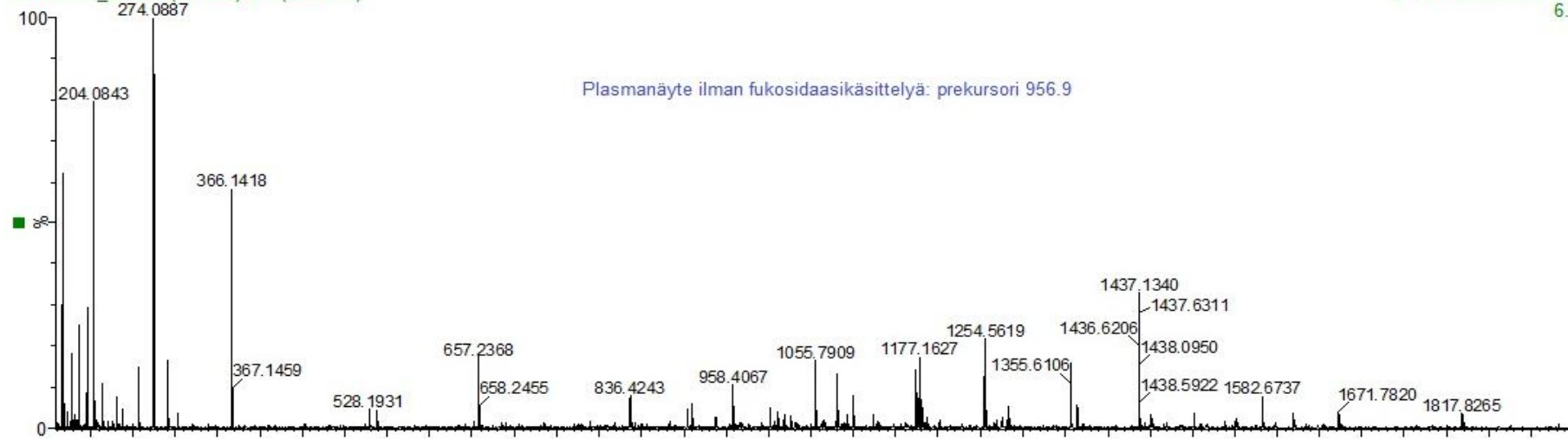
Fukosidaasikäsitellyistä plasma- ja IgG-näytteistä löytyi Glycopeptide ID –analyysissä useita samoja proteiineja kuin käsittelemättömistä näytteistä, mutta ilman fukoositähdettä lasketussa koostumuksessa ja vastaavasti 146 Da (fukoositähteen massa) pienentyneellä kokonaismassalla (taulukko 8). Myös manuaalisessa MS/MS-spektrianalyysissä saatiin vahvistus fukoositähteen puuttumiselle (kuvat 16 ja 17).

Plasma, tietokanta Core3020						
Näyte käsitelty fukosidaasilla	Prekursori	z	Kokonais-massa	Koostumus	Proteiini	Sekvenssi
-	955,64	4	3818,58	S2H5N4F1	APOH_HUMAN	VYKPSAGNNSLYR
+	919,13	4	3672,53	S2H5N4	APOH_HUMAN	VYKPSAGNNSLYR
			146,05	←erotus		
-	1252,50	3	3754,49	S2H5N4F1	HEMO_HUMAN	SWPAVGNCSSALR
+	1203,82	3	3608,46	S2H5N4	HEMO_HUMAN	SWPAVGNCSSALR
			146,03			
-	1179,76	4	4715,04	S2H5N4F1	FETUA_HUMAN	AALAAFNAQNNGSNFQLEEISR
+	1143,22	4	4568,90	S2H5N4	FETUA_HUMAN	AALAAFNAQNNGSNFQLEEISR
			146,14			
IgG, tietokanta IgG_HC_Human						
	Prekursori	z	Kokonais-massa	Koostumus	Proteiini	Sekvenssi
-	922,03	3	2763,10	H4N4F1	IGHG2_HUMAN	EEQFNSTFR
+	873,35	3	2617,04	H4N4	IGHG2_HUMAN	EEQFNSTFR
			146,06			
-	976,05	3	2925,16	H5N4F1	IGHG2_HUMAN	EEQFNSTFR
+	927,36	3	2779,09	H5N4	IGHG2_HUMAN	EEQFNSTFR
			146,07			
-	1073,16	3	3216,49	S1H5N4F1	IGHG2_HUMAN	EEQFNSTFR
+	1024,39	3	3070,18	S1H5N4	IGHG2_HUMAN	EEQFNSTFR
			146,31			
-	852,91	4	3407,65	H5N4F1	IGHG2_HUMAN	TKPREEQFNSTFR
+	816,40	4	3261,59	H5N4	IGHG2_HUMAN	TKPREEQFNSTFR
			146,06			

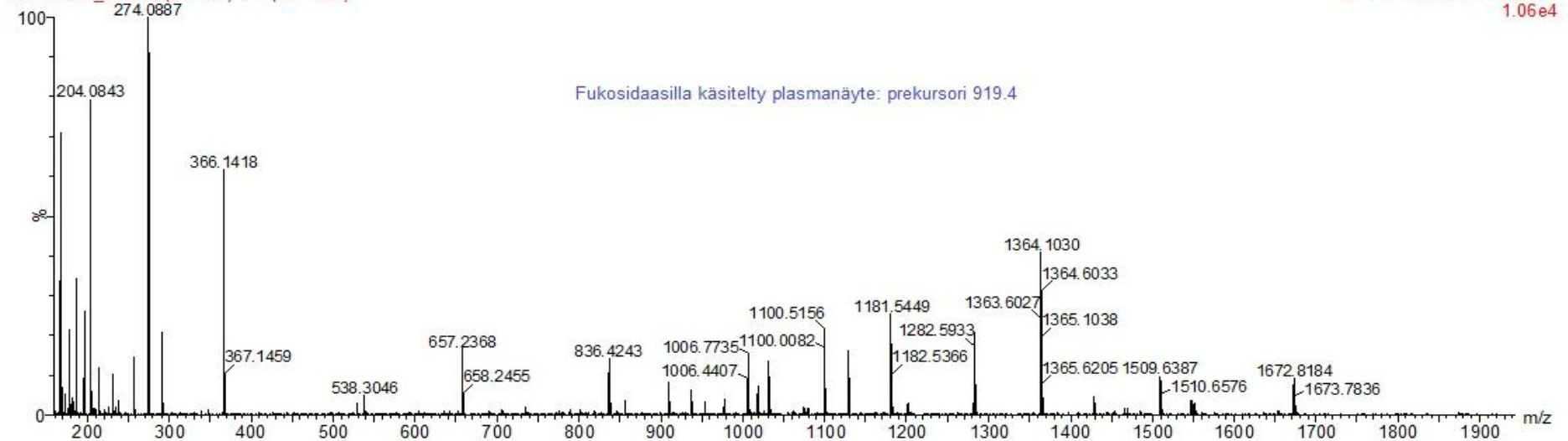
Taulukko 8. Tyvifukoosiparit plasma- ja IgG-näytteistä. Fukosidaasilla käsitellyistä näytteistä löytyy glykoproteiineja, joista fukoosi puuttuu.

PLASMA_LCH_5UL_DDA

20120608_02 200 (19.942) Cm (200:218)



20120608_08 141 (20.061) Cm (137:155)



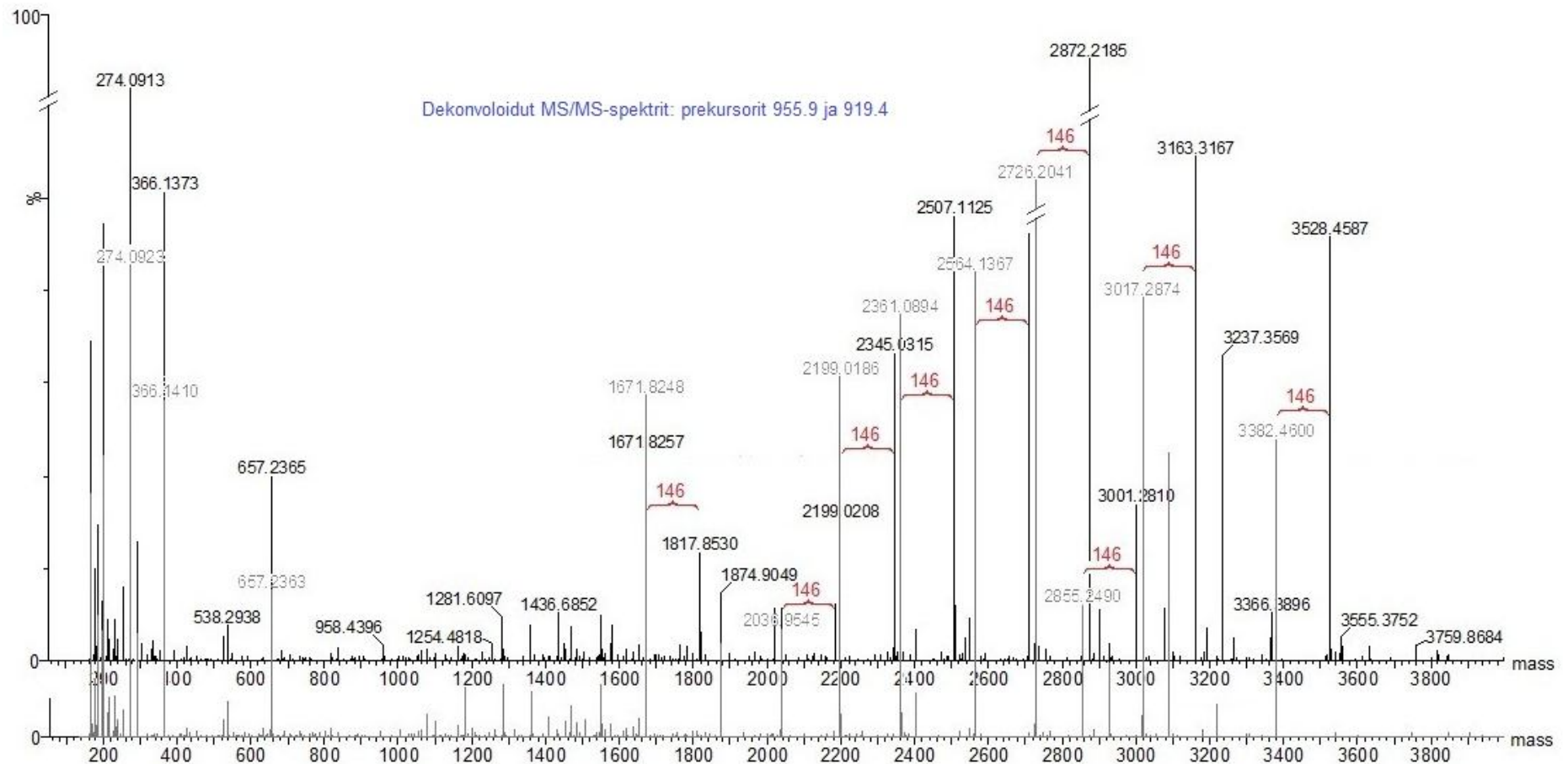
Kuva 16. Fukosidaasilla käsitellystä plasmanäytteestä löytyy ioni 919,4, joka hajotuksessa näyttää tuottavan samankaltaisia fragmentteja kuin käsittelemättömän näytteen ioni 956,9. Fragmentteissa on havaittavissa säännöllinen siirtymä alemmas m/z-akselilla, mikä voi olla osoitus tyvifukoositähteen eroavuudesta näiden glykopeptidien välillä.

PLASMA_LCH_5UL_DDA

20120608_02 200 (19.942) M3 [Ev-497041,lt50,En1] (0.050,200.00,0.200,1400.00,4,Cmp); Cm (200:218)

10-Jun-20122: T OF MSMS 955.89ES+
4.32e4**PLASMA_LCH_FUCOSIDA SE_5UL_DDA**

20120608_08 141 (20.061) M3 [Ev-526915,lt50,En1] (0.050,200.00,0.200,1400.00,4,Cmp); Cm (137:155)

2: T OF MSMS 919.39ES-
8.66e4

Kuva 17. Päälekkäin asetetut prekurorien 955,9 ja 919,4 dekonvoloidut MS/MS-spektrit havainnollistavat korkean intensiteetin peptidi+glykaani-piikkien massaeron 146, joka on seurausta tyvifukoosin puuttumisesta fukosidaasilla käsitellyssä plasmanäytteessä. Glycopeptide ID identifioi kyseisen proteiinin apolipoproteiini H:ksi.

5. TULOSTEN TARKASTELU

Malliaineen analyysi osoittaa Glycopeptide ID:n identifioivan suurella varmuudella IgG2-peräisen peptidin glykaanilla H4N4F1: tämä osuma on kokonaispistemäärältään suurin kaikkia kolmea tietokantaa vastaan ajettuna. Spektrin ollessa laadukas jää tulkinnanvaraa hyvin vähän, ja tulosta voidaan pitää hyvällä todennäköisyydellä oikeana.

Myöskään plasmanäytteestä löydetty tyvifukosyloidut glykaanit eivät jätä paljoakaan mahdollisuuksia tulkinnoille, joissa tyvirakenne ei sisältäisi fukoosia, kun otetaan huomioon fukosyloitujen tyvipalasten runsas esiintyminen spektreissä (taulukko 7, s. 47). Fukosidaasikäsittely näyttää toimineen toivotulla tavalla, sillä käsiteltyjen peptidien MS- ja MS/MS-spektreistä voidaan havaita fukoositähteen puuttuminen. Samaan johtopäätökseen päästään niin manuaalisella kuin Glycopeptide ID –analyysilläkin.

Plasman analyysin tuloksia tarkasteltaessa on silmiinpistävää, että yksi glykaanikompositio on huomattavasti yleisempi kuin muut. 30 parhaan osuman (rank 1) joukossa esiintyy koostumus S2H5N4F1 14 kertaa Core3020- ja 12 kertaa SPHuman-tietokantaa vastaan ajettuna. Tämä koostumus vastaa rakenteena todennäköisesti tyvifukosyloitua biantennaarista kompleksista N-glykaania, eikä sen yleisyys siten ole yllättävää. Myös muut analyysissä saadut koostumukset vastaavat pääosin biantennaarisia, kompleksisia N-glykaaneja – moniantennaariset sekä hybridi- tai high mannose –rakenteet ovat harvinaisempia löydöksiä (taulukko 9).

On huomioitava, ettei Glycopeptide ID anna glykaanirakennetta vaan glykaanikoostumuksen. Taulukossa 9 kullekin osumalle annettu rakenne on vain yksi mahdollinen glykaanirakenne, johon koostumus sopii.

Mahdollinen rakenne	Glykaani-koostumus	Proteiini	N-kohta	Aiempaa näyttöä glykaanista
	S2H5N4F1	FETUA_HUMAN	176	kyllä
	S2H5N4F1	TRFE_HUMAN	630, 637*	kyllä
	S2H5N4F1	APOH_HUMAN	162	kyllä
	S2H5N4F1	HEMO_HUMAN	187	kyllä
	S2H5N4F1	CERU_HUMAN	138, 358	kyllä
	S2H5N4F1	(APOD_HUMAN)	98	kyllä
	S1H5N4F1	(TRFE_HUMAN)	630, 637*	kyllä
	H4N4F1	IGHG2_HUMAN	176	kyllä
	H5N4F1	IGHG2_HUMAN	176	kyllä
	H5N4F1	IGHG1_HUMAN	176	kyllä
	H3N4F1	IGHG4_HUMAN	176	kyllä
	S3H5N6F3	(VP13A_HUMAN)	2635	ei
	S2H5N3F1	(NEBU_HUMAN)	6029	ei
	S1H8N7F2	(MYO6_HUMAN)	1067	ei
	S2H4N5F1	(Q9Y607_HUMAN)	171	ei
	S1H6N3F2	(PTPRG_HUMAN)	619, 631*	ei**
	H5N5F2	(MUCB_HUMAN)	147	ei**
	H12N2	(FETUA_HUMAN)	176	ei terveellä

Taulukko 9. Esimerkkejä plasman analyysituloksista. Esitetty glykaanirakenne on analyysissä määritetyn koostumuksen perusteella mahdollinen, mutta ei välttämättä oikea. Taulukkoon on listattu myös proteiineja, joita ei voida pitää identifioituina heikon peptidipistemäärän vuoksi, vaikka glykaanipistemäärä on hyvä ja glykaanikoostumus siten todennäköisesti lähellä oikeaa. Proteiini on laitettu sulkuihin, jos osuman peptidipistemäärä on alle 40. Aiempi näyttö glykaanista on ilmoitettu UniProt-tietokannan tietojen perusteella.

* Samassa peptidissä kaksi N-kohtaa; glykaanin sijaintia ei tiedetä varmasti.

** N-glykosylaatiota havaittu muissa kohdissa proteiinia.

Verrattaessa Core3020- ja SPHuman-tietokantoja vastaan suoritettuja analyysejä havaitaan pistemäärältään parhaiden tulosten vastaavaan toisiaan melko hyvin, mutta listalla alaspäin mentäessä on osumissa eroja lisääntyvässä määrin (taulukot 5 ja 6). On järkevää olettaa Core3020-tietokannan tulosten osuvan todennäköisemmin oikeaan, sillä väärin positiivisten todennäköisyys plasmanäytteestä pienenee tietokannan ollessa rajattu plasmasta löytyviin proteiineihin. Esimerkkinä on SPHuman-analyysituloksissa suhtellisen korkealla pistemäärällä proteiini CI139_HUMAN, jolle UniProtista löytyy nimi ”Uncharacterized protein C9orf139”. Tästä kromosomista 9. löytyvästä proteiinista ei tunneta muuta kuin sekvenssi, ja on epätodennäköistä, että näin huonosti karakterisoitu proteiini löytyisi plasmasta niin suurissa määrin, että se voitaisiin tunnistaa yhdessä yleisesti tunnettujen plasman glykoproteiinien (kuten IgG, fetuiini A ja serotransferriini) kanssa.

Myös Core3020-tietokannan osumien oikeellisuus on kyseenalainen ensimmäisten hyvien pistemäärien jälkeen: useilla hyvän glykaanipistemäärän saaneilla osumilla on peptidipistemäärä huomattavan alhainen, ja y- ja b-ioneja on saatu osumaan ainoastaan muutama pitkistä sekvenssistä. Vierekkäisten y- ja b-ionien puuttuminen laskee osuman arvoa selvästi. Esimerkiksi sijoituksiltaan peräkkäiset osumat NEBU_HUMAN (nebuliini) ja CERU_HUMAN (seruloplasmiini) ovat kokonaispistemäärältään hyvin lähellä toisiaan, mutta tarkastelemalla peptidifragmenttiosumia ei nebuliinia voida missään nimessä pitää identifioituna – 23 aminohapon mittaisesta sekvenssistä on löydettävissä ainoastaan yksi b-ioni ja kaksi y-iona. Seruloplasmiinin lyhyemmästä sekvenssistä sen sijaan löytyy neljä b-iona ja neljä y-iona, minkä lisäksi peräkkäiset b-ionit lisäävät osuman oikeellisuuden todennäköisyyttä (kuva 18).

	Total score	Peptide score	Glycan score
NEBU	241,52	27,76	213,76
CERU	237,88	46,86	191,02

NEBU

b

	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	
D	L	E	L	E	V	K	G	R	G	L	N	A	M	A	N	E	T	P	D	F	M	R	
23	22	21	20	19	18	17	16	15	14	13	12	11	10	9	8	7	6	5	4	3	2	1	y

CERU

b

	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	
E	H	E	G	A	I	Y	P	D	N	T	T	D	F	Q	R	
16	15	14	13	12	11	10	9	8	7	6	5	4	3	2	1	y

Kuva 18. Kokonaispistemäärä ei itsessään kerro osuman luotettavuudesta riittävästi. Alhaisellakin peptidipistemäärällä voi osuma olla sijoitukseltaan korkealla, jos glykaanipistemäärä on suuri. Peptidin tunnistaminen luotettavasti vaatii useita, mielellään sekvenssissä peräkkäisiä y- ja b-ioneja.

6. JOHTOPÄÄTÖKSET

Malliaineen analyysin perusteella Glycopeptide ID –ohjelma on onnistunut uskottavasti identifioimaan tyvifukosyloituja N-glykopeptidejä vertaamalla syötettyä MS/MS-spektriä erilaisia peptiditietokantoja vastaan. Tyvifukosyloitujen glykopeptidien CID-fragmentoinnissa syntyy sarja fukoositähteen sisältäviä tyvirakenteen palasia, joiden avulla tyvifukosylaation tunnistaminen on ilmeisen luotettavaa tunnetun malliaineen, IgG:n, spektrin *in silico* -analyysin perusteella. Myös tuntemattomia proteiineja sisältävästä plasmanäytteestä identifioitiin useita, kirjallisuudesta ennestään tyvifukosin sisältäviksi tiedettyjä glykoproteiineja.

Valittu tietokanta, jota vastaan analyysi suoritettiin, vaikutti suuresti erityisesti alemman kokonaispistemäärän peptidiosumiin. Mitä spesifisempi eli tiukemmin rajattu tietokanta oli, sitä luotettavampina tuloksia voidaan pitää. Epäspesifissä tietokannassa väärin positiivisten todennäköisyys kasvaa. Suuressa tietokannassa on peptidien sovituksessa jatkoon pääsevien peptidien lukumäärää vastaavasti suurennettava, jotta todennäköisyys oikean peptidin peptidipistemäärän riittämiseksi jatkoonpääsyyn kasvaa. Tällaisen peptidin kokonaispistemäärä voi lopulta olla huomattavasti korkeampi kuin muiden, pelkältä peptidipistemäärältään parempien osumien kokonaispistemäärä, mutta se voi alun karsinnoissa suodattua pois tiukan peptidirajan vuoksi. Kasvatettaessa jatkoon pääsevien peptidien lukumäärää tulee ongelmaksi analyysin laskenta-ajan pidentyminen, minkä vuoksi rajaa ei voida laskea loputtomasti varsinkaan silloin, kun halutaan analysoida suuri määrä spektrejä. Käytännön rajoituksia voi asettaa myös analyysin tulostiedostojen suureneva koko.

CID:ssä glykaanin taipumus fragmentoitua alhaisemmilla törmäysenergioilla asettaa haasteita sellaisen MS/MS-spektrin saamiseksi, jossa sekä peptidi- että glykaanisarjat ovat riittävän hyviä peptidin tunnistukseen ja glykaanikoostumuksen määrittämiseen. Tässä työssä peptidin identifiointiin oli usein käytettävissä liian heikkolaatuiset y- ja b-sarjat, jolloin osumia ei voida pitää luotettavina. Osuman luotettavuuden arviointi vaatii pelkän kokonaispistemäärän tarkastelun lisäksi sen osatekijöiden, eli peptidipistemäärän ja $\Delta m/z$ -arvon, tarkastelua. Oleellista oikean identifioinnin saavuttamiseksi on siis jo fragmentointimenetelmän huolellinen optimointi, sillä heikosta spektristä ei voida tehdä hyvää tulkintaa analyysiohjelman toimivuudesta riippumatta.

Hieman yllättävänä voidaan pitää glykopeptidien rikastuksessa käytettyjen, glykaanihaarojen fukosiitäreille spesifisten UEA- ja AAL-lektiinien toimimattomuutta. Olettaen näiden lektiinien olleen laadultaan moitteettoman, on mahdollista myös, ettei plasmanäytteessä alunperinkään ollut riittävästi haarafukosyloitua glykoproteiineja niistä saatujen peptidien rikastamiseksi siinä määrin, että käytetyn MS-laitteiston herkkyys riittäisi niiden havaitsemiseksi. Tällöin plasmaa olisi yksinkertaisesti puhdistettava suurempi tilavuus.

Tässä työssä on osoitettu Glycopeptide ID:n olevan lupaava väline erilaisten tyvifukosyloitujen N-glykopeptidien identifiointiin. Manuaaliseen spektrintulkintaan verrattuna ohjelma tuo huomattavan ajansäästön mahdollistaessaan satojen spektrien analyysin tunneissa. Tyvifukosylaation ollessa kiinteästi yhteydessä monenlaisten syöpien ja muiden patologisten tilojen kanssa on tämänkaltaisten automatisoitujen MS/MS-spektrintulkintavälineiden kehityksen hyöty ilmeinen: uusien tyvifukosyloitujen syöpä- ja muiden sairauksien merkkiaineiden löytäminen helpottuu huomattavasti hitaan inhimillisen spektrintulkintavaiheen poistuessa. Kliinisen analytiikan lisäksi sovelluskohteita voi löytyä myös biotieteellisen perustutkimuksen parista esimerkiksi mikro- ja molekyylibiologian tutkimuksessa proteiinien post-translaationaalisten modifikaatioiden selvittämisessä.

7. VIITTEET

- (1) Berger, O.; McBride, R.; Razi, N.; Paulson, J. Symbol Notation Extension For Pathogen Polysaccharides (Proposal).
<http://www.functionalglycomics.org/static/consortium/Nomenclature.shtml> (accessed 06/05, 2012).
- (2) Apweiler, R.; Hermjakob, H.; Sharon, N. On the frequency of protein glycosylation, as deduced from analysis of the SWISS-PROT database. *Biochimica et Biophysica Acta* **1999**, *1473*, 4-8.
- (3) Liu, T.; Qian, W.; Gritsenko, M. A.; Camp II, D. G.; Monroe, M. E.; Moore, R. J.; Smith, R. D. Human Plasma N-Glycoproteome Analysis by Immunoaffinity Subtraction, Hydrazide Chemistry, and Mass Spectrometry. *Journal of Proteome Research* **2005**, *4*, 2070–2080.
- (4) Pasing, Y.; Sickmann, A.; Lewandrowski, U. N-glycoproteomics: mass spectrometry-based glycosylation site annotation. *Biological Chemistry* **2012**, *393*, 249-258.
- (5) Varki, A. Biological roles of oligosaccharides: all of the theories are correct. *Glycobiology* **1993**, *3*, 97-130.
- (6) Huddleston, M. J.; Bean, M. F.; Carr, S. A. Collisional fragmentation of glycopeptides by electrospray ionization LC/MS and LC/MS/MS: methods for selective detection of glycopeptides in protein digests. *Analytical Chemistry* **1993**, *65*, 877-884.
- (7) Aeby, M.; Bernasconi, R.; Clerc, S.; Molinari, M. N-glycan structures: recognition and processing in the ER. *Trends Biochem. Sci.* **2010**, *35*, 74-82.
- (8) Parodi, A. J.; Leloir, L. F. Lipid Intermediates in Protein Glycosylation. *Trends Biochem. Sci.* **1976**, *1*, 58-59.
- (9) Ohtsubo, K.; Marth, J. D. Glycosylation in Cellular Mechanisms of Health and Disease. *Cell* **2006**, *126*, 855-867.
- (10) Meezan, E.; Wu, H. C.; Black, P. H.; Robbins, P. W. Comparative Studies on the Carbohydrate-containing membrane components of normal and virus-transformed mouse fibroblasts. II. Separation of glycoproteins and glycopeptides by Sephadex chromatography. *Biochemistry* **1969**, *8*, 2518-2524.
- (11) Rademacher, T. W.; Parekh, R. B.; Dwek, R. A. Glycobiology. *Annual Review of Biochemistry* **1988**, *57*, 785-838.
- (12) Spiro, R. G. Protein glycosylation: nature, distribution, enzymatic formation, and disease implications of glycopeptide bonds. *Glycobiology* **2002**, *12*, 43R-56R.

- (13) Singh, D. G.; Lomako, J.; Lomako, W. M.; Whelan, W. J.; Meyer, H. E.; Serwe, M.; Metzger, J. W. beta-Glucosylarginine: a new glucose-protein bond in a self-glucosylating protein from sweet corn. *FEBS letters* **1995**, *27*, 61-64.
- (14) de Beer, T.; Vliegthart, J. F.; Löffler, A.; Hofsteenge, J. The hexopyranosyl residue that is C-glycosidically linked to the side chain of tryptophan-7 in human RNase Us is alpha-mannopyranose. *Biochemistry* **1995**, *34*, 11785-11789.
- (15) Bause, E.; Legler, G. The role of the hydroxy amino acid in the triplet sequence Asn-Xaa-Thr(Ser) for the N-glycosylation step during glycoprotein biosynthesis. *The Biochemical Journal* **1981**, *195*, 639-644.
- (16) Helenius, J.; Aeby, M. Transmembrane movement of dolichol linked carbohydrates during N-glycoprotein biosynthesis in the endoplasmic reticulum. *Seminars in Cell & Developmental Biology* **2002**, *13*, 171-178.
- (17) Dempski, R. E.; Imperiali, B. Oligosaccharyl transferase: gatekeeper to the secretory pathway. *Current Opinion in Chemical Biology* **2002**, *6*, 844-850.
- (18) Parodi, A. J. Protein glucosylation and its role in protein folding. *Annual Review of Biochemistry* **2000**, *69*, 69-93.
- (19) Uozumi, N.; Yanagidani, S.; Miyoshi, E.; Ihara, Y.; Sakuma, T.; Gao, C. X.; Teshima, T.; Fujii, S.; Shiba, T.; Taniguchi, N. Purification and cDNA cloning of porcine brain GDP-L-Fuc:N-acetyl-beta-D-glucosaminide alpha1-->6fucosyltransferase. *The Journal of Biological Chemistry* **1996**, *271*, 27810-27817.
- (20) Wang, X.; Inoue, S.; Gu, J.; Miyoshi, E.; Noda, K.; Li, W.; Mizuno-Horikawa, Y.; Nakano, M.; Asahi, M.; Takahashi, M.; Uozumi, N.; Ihara, S.; Lee, S. H.; Ikeda, Y.; Yamaguchi, Y.; Aze, Y.; Tomiyama, Y.; Fujii, J.; Suzuki, K.; Kondo, A.; Shapiro, S. D.; Lopez-Otin, C.; Kuwaki, T.; Okabe, M.; Honke, K.; Taniguchi, N. Dysregulation of TGF-beta1 receptor activation leads to abnormal lung development and emphysema-like phenotype in core fucose-deficient mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **2005**, *102*, 15791-15796.
- (21) Yamashita, K.; Hitoi, A.; Tateishi, N.; Higashi, T.; Sakamoto, Y.; Kobata, A. Organ-specific difference in the sugar chains of gamma-glutamyltranspeptidase. *Archives of Biochemistry and Biophysics* **1983**, *225*, 993-996.
- (22) Wu, X.; Steet, R. A.; Bohorov, O.; Bakker, J.; Newell, J.; Krieger, M.; Spaapen, L.; Kornfeld, S.; Freeze, H. H. Mutation of the COG complex subunit gene COG7 causes a lethal congenital disorder. *Nature Medicine* **2004**, *10*, 518-523.
- (23) Ju, T.; Cummings, R. T. Protein glycosylation: chaperone mutation in Tn syndrome. *Nature* **2005**, *27*, 1252.
- (24) Leavitt, R.; Schlesinger, S.; Kornfeld, S. Impaired intracellular migration and altered solubility of nonglycosylated glycoproteins of vesicular stomatitis virus and Sindbis virus. *The Journal of Biological Chemistry* **1977**, *252*, 9018-9023.

- (25) Hickman, S.; Kulczycki, A.; Lynch, R. G.; Kornfeld, S. Studies of the mechanism of tunicamycin in inhibition of IgA and IgE secretion by plasma cells. *The Journal of Biological Chemistry* **1977**, *252*, 4402-4408.
- (26) Lu, D.; Yang, C.; Liu, Z. How hydrophobicity and the glycosylation site of glycans affect protein folding and stability: a molecular dynamics simulation. *The Journal of Physical Chemistry B* **2012**, *116*, 390-400.
- (27) Cheng, S.; Edwards, S. A.; Jiang, Y.; Gräter, F. Glycosylation enhances peptide hydrophobic collapse by impairing solvation. *ChemPhysChem* **2010**, *11*, 2367-2374.
- (28) Banks, D. D. The effect of glycosylation on the folding kinetics of erythropoietin. *Journal of Molecular Biology* **2011**, *412*, 536-550.
- (29) Varki, A.; Cummings, R.; Esko, J.; Freeze, H.; Hart, G.; Marth, J. In *Essentials of Glycobiology*; Cold Spring Harbor: New York, 1999; .
- (30) Bergsten, G.; Wullt, B.; Svanborg, C. Escherichia coli, fimbriae, bacterial persistence and host response induction in the human urinary tract. *International Journal of Medical Microbiology* **2005**, *295*, 487-502.
- (31) Sauer, F. G.; Mulvey, M. A.; Schilling, J. D.; Martinez, J. J.; Hultgren, S. J. Bacterial pili: molecular mechanisms of pathogenesis. *Current Opinion in Microbiology* **2000**, *3*, 65-72.
- (32) Sharon, N. Carbohydrates as future anti-adhesion drugs for infectious diseases. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects* **2006**, *1760*, 527-537.
- (33) Mitoma, J.; Bao, X.; Petryanik, B.; Schaerli, P.; Gauguier, J. M.; Yu, S. Y.; Kawashima, H.; Saito, H.; Ohtsubo, K.; Marth, J. D.; Khoo, K. H.; von Andrian, U. H.; Lowe, J. B.; Fukuda, M. Critical functions of N-glycans in L-selectin-mediated lymphocyte homing and recruitment. *Nature Immunology* **2007**, *4*, 409-418.
- (34) Gu, J.; Taniguchi, N. Regulation of integrin functions by N-glycans. *Glycoconjugate Journal* **2004**, *21*, 9-15.
- (35) Fogel, A. I.; Li, Y.; Giza, J.; Wang, Q.; Lam, T. T.; Modis, Y.; Biederer, T. N-glycosylation at the SynCAM (synaptic cell adhesion molecule) immunoglobulin interface modulates synaptic adhesion. *The Journal of Biological Chemistry* **2010**, *285*, 34864-34874.
- (36) Mendelsohn, R.; Cheung, P.; Berger, L.; Partridge, E.; Lau, K.; Datti, A.; Pawling, J.; Dennis, J. W. Complex N-Glycan and Metabolic Control in Tumor Cells. *Cancer Research* **2007**, *67*, 9771-9780.
- (37) Hakomori, S. Tumor-associated glycolipid antigens, their metabolism and organization. *Chemistry and Physics of Lipids* **1986**, *42*, 209-233.
- (38) Pangburn, M. K. Host recognition and target differentiation by factor H, a regulator of the alternative pathway of complement. *Immunopharmacology* **2000**, *49*, 149-157.

- (39) Tatsumura, T.; Sato, H.; Mori, A.; Komori, Y.; Yamamoto, K.; Fukatani, G.; Kuno, S. Clinical Significance of Fucose Level in Glycoprotein Fraction of Serum in Patients with Malignant Tumors. *Cancer Research* **1977**, *37*, 4101-4103.
- (40) Naitoh, A.; Aoyagi, Y.; Asakura, H. Highly enhanced fucosylation of serum glycoproteins in patients with hepatocellular carcinoma. *Journal of Gastroenterology and Hepatology* **1999**, *5*, 436-445.
- (41) Noda, K.; Miyoshi, E.; Gu, J.; Gao, C. X.; Nakahara, S. Relationship between elevated FX expression and increased production of GDP-L-fucose, a common donor substrate for fucosylation in human hepatocellular carcinoma and hepatoma cell lines. *Cancer Research* **2003**, *63*, 6282-6289.
- (42) Nakagawa, T.; Uozumi, N.; Nakano, M.; Mizuno-Horikawa, Y.; Okuyama, N.; Taguchi, T.; Gu, J.; Kondo, A.; Taniguchi, N.; Miyoshi, E. Fucosylation of N-glycans regulates the secretion of hepatic glycoproteins into bile ducts. *The Journal of Biological Chemistry* **2006**, *281*, 29797-29806.
- (43) Saldova, R.; Fan, Y.; Fitzpatrick, J. M.; Watson, R. W.; Rudd, P. M. Core fucosylation and alpha2-3 sialylation in serum N-glycome is significantly increased in prostate cancer comparing to benign prostate hyperplasia. *Glycobiology* **2011**, *21*, 195-205.
- (44) Sarrats, A.; Saldova, R.; Pla, E.; Fort, E.; Harvey, D. J.; Struwe, W. B.; de Llorens, R.; Rudd, P. M.; Peracaula, R. Glycosylation of liver acute-phase proteins in pancreatic cancer and chronic pancreatitis. *Proteomics. Clinical Applications* **2010**, *4*, 432-448.
- (45) Zhao, Y. P.; Ruan, C. P.; Wang, H.; Hu, Z. Q.; Fang, M.; Gu, X.; Ji, J.; Zhao, J. Y.; Gao, C. F. Identification and assessment of new biomarkers for colorectal cancer with serum N-glycan profiling. *Cancer* **2011**, *118*, 639-650.
- (46) Hamilton, R. G. Human IgG subclass measurements in the clinical laboratory. *Clinical Chemistry* **1987**, *33*, 1707-1725.
- (47) Iida, S.; Misaka, H.; Inoue, M.; Shibata, M.; Nakano, R.; Yamane-Ohnuki, N.; Wakitani, M.; Yano, K.; Shitara, K.; Satoh, M. Nonfucosylated therapeutic IgG1 antibody can evade the inhibitory effect of serum immunoglobulin G on antibody-dependent cellular cytotoxicity through its high binding to FcgammaRIIIa. *Clinical Cancer Research* **2006**, *12*, 2879-2887.
- (48) Wuhrer, M.; Porcelijn, L.; Kapur, R.; Koeleman, C. A.; Deelder, A.; de Haas, M.; Vidarsson, G. Regulated glycosylation patterns of IgG during alloimmune responses against human platelet antigens. *Journal of Proteome Research* **2009**, *8*, 450-456.
- (49) Edri-Brami, M.; Rosental, B.; Hayoun, D.; Welt, M.; Rosen, H.; Wirguin, I.; Nefussy, B.; Drory, V. E.; Porgador, A.; Lichtenstein, R. G. Glycans in sera of amyotrophic lateral sclerosis patients and their role in killing neuronal cells. *PLoS One* **2012**, *7*, e35772.
- (50) Maresca, B.; Cigliano, L.; Corsaro, M. M.; Pieretti, G.; Natale, M.; Bucci, E. M.; Dal Piaz, F.; Balato, N.; Nino, M.; Ayala, F.; Abrescia, P. Quantitative determination of haptoglobin glycoform variants in psoriasis. *Biological Chemistry* **2010**, *391*, 1429-1439.

- (51) El-Rassi, Z. In *Carbohydrate Analysis by Modern Chromatography and Electrophoresis (Journal of Chromatography Library)*; Elsevier Science Ltd: 2002; .
- (52) Morris, H. R.; Geddes, A. J.; Graham, G. N. Some Problems Associated with the Amino Acid-Sequence Analysis of Proteins by Mass Spectrometry. *Biochemical Journal* **1969**, *111*, 38.
- (53) Morris, H. R.; Williams, D. H. Determination of the Sequences of Protein-Derived Peptides and Peptide Mixtures by Mass Spectrometry. *Biochemical Journal* **1971**, *125*, 189-201.
- (54) Morris, H. R.; Thompson, M. R.; Osuga, D. T.; Ahmed, A. I.; Chan, S. M.; Vandenhede, J. R.; Feeney, R. E. Antifreeze Glycoproteins from the Blood of an Antarctic Fish. *The Journal of Biological Chemistry* **1978**, *253*, 5155-5162.
- (55) Morris, H. R.; Greer, F. M. Mass spectrometry of natural and recombinant proteins and glycoproteins. *Trends in Biotechnology* **1988**, *6*, 140-147.
- (56) Pappin, D. J. C.; Hojrup, P.; Bleasby, A. J. Rapid identification of proteins by peptide-mass fingerprinting. *Current Biology* **1993**, *3*, 327-332.
- (57) Conboy, J. J.; Henion, J. D. The determination of glycopeptides by liquid chromatography/mass spectrometry with collision-induced dissociation. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **1992**, *3*, 804-814.
- (58) Carr, S. A.; Huddleston, M. J.; Bean, M. F. Selective identification and differentiation of N- and O-linked oligosaccharides in glycoproteins by liquid chromatography-mass spectrometry. *Protein Science* **1993**, *2*, 183-196.
- (59) Roepstorff, P.; Fohlman, J. Proposal for a common nomenclature for sequence ions in mass-spectra of peptides. *Biomedical Mass Spectrometry* **1984**, *11*, 601.
- (60) Cordero, M. M.; Houser, J. J.; Wesdemiotis, C. The neutral products formed during backbone fragmentations of protonated peptides in tandem mass spectrometry. *Analytical Chemistry* **1993**, *65*, 1594-1601.
- (61) Harrison, A. G. To b or not to b: The ongoing saga of peptide b ions. *Mass Spectrometry Reviews* **2009**, *28*, 640-654.
- (62) Schlosser, A.; Lehmann, W. D. Five-membered ring formation in unimolecular reactions of peptides: a key structural element controlling low-energy collision-induced dissociation of peptides. *Journal of Mass Spectrometry* **2000**, *35*, 1382-1390.
- (63) Hiserodt, R. D.; Brown, S. M.; Swijter, D. F.; Hawkins, N.; Mussinan, C. J. A study of b1+H2O and b1-ions in the product ion spectra of dipeptides containing N-terminal basic amino acid residues. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry* **2007**, *18*, 1414-1422.
- (64) Zhang, Z. Prediction of low-energy collision-induced dissociation spectra of peptides. *Analytical Chemistry* **2004**, *76*, 3908-3922.

- (65) Zhang, Z. Prediction of low-energy collision-induced dissociation spectra of peptides with three or more charges. *Analytical Chemistry* **2005**, 77, 6364-6373.
- (66) Huang, Y.; Triscari, J. M.; Tseng, G. C.; Pasa-Tolic, L.; Lipton, M. S.; Smith, R. D.; Wysocki, V. H. Statistical characterization of the charge state and residue dependence of low-energy CID peptide dissociation patterns. *Analytical Chemistry* **2005**, 77, 5800-5813.
- (67) Domon, B.; Costello, C. E. A systematic nomenclature for carbohydrate fragmentation in FAB-MS/MS spectra of glycoconjugates. *Glycoconjugate Journal* **1988**, 5, 397-409.
- (68) Harvey, D. J.; Bateman, R. H.; Green, M. R. High-energy collision-induced fragmentation of complex oligosaccharides ionized by matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry. *Journal of Mass Spectrometry* **1997**, 32, 167-187.
- (69) Pfenniger, A.; Karas, M.; Finke, B.; Stahl, B. Structural analysis of underivatized neutral human milk oligosaccharides in the negative ion mode by nano-electrospray MS(n). *Journal of the American Society for Mass Spectrometry* **2002**, 13, 1331-1340.
- (70) Demelbauer, U. M.; Zehl, M.; Plematl, A.; Allmaier, G.; Rizzi, A. Determination of glycopeptide structures by multistage mass spectrometry with low-energy collision-induced dissociation: comparison of electrospray ionization quadrupole ion trap and matrix-assisted laser desorption/ionization quadrupole ion trap reflectron time-of-flight approaches. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* **2004**, 18, 1575-1582.
- (71) Jebanathirajah, J.; Steen, H.; Roepstorff, P. Using optimized collision energies and high resolution, high accuracy fragment ion selection to improve glycopeptide detection by precursor ion scanning
. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry* **2003**, 14, 777-784.
- (72) Little, D. P.; Speir, J. P.; Senko, M. W.; O'Connor, P. B.; McLafferty, F. W. Infrared multiphoton dissociation of large multiply charged ions for biomolecule sequencing. *Analytical Chemistry* **1994**, 66, 2809-2815.
- (73) Cooper, H. J.; Håkansson, K.; Marshall, A. G. The role of electron capture dissociation in biomolecular analysis
. *Mass Spectrometry Reviews* **2005**, 24, 201-222.
- (74) Håkansson, K.; Chalmers, M. J.; Quinn, J. P.; McFarland, M. A.; Hendrickson, C. L.; Marshall, A. G. Combined Electron Capture and Infrared Multiphoton Dissociation for Multistage MS/MS in a Fourier Transform Ion Cyclotron Resonance Mass Spectrometer. *Analytical Chemistry* **2003**, 75, 3256-3262.
- (75) Syka, J. E.; Coon, J. J.; Schroeder, M. J.; Shabanowitz, J.; Hunt, D. F. Peptide and protein sequence analysis by electron transfer dissociation mass spectrometry. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **2004**, 101, 9528-9533.
- (76) Wiesner, J.; Premisler, T.; Sickmann, A. Application of electron transfer dissociation (ETD) for the analysis of posttranslational modifications. *Proteomics* **2008**, 8, 4466-4483.

- (77) Domon, B.; Aebersol, R. Mass Spectrometry and Protein Analysis. *Science* **2006**, *312*, 212-217.
- (78) Schey, K. L.; Cooks, R. G. Ion/surface collision phenomena in an improved tandem time-of-flight instrument. *International Journal of Mass Spectrometry and Ion Processes* **1989**, *112*, 121-166.
- (79) Medzihradszky, K. F.; Campbell, J. M.; Baldwin, M. A.; Falick, A. M.; Juhasz, P.; Vestal, M. L.; Burlingame, A. L. The Characteristics of Peptide Collision-Induced Dissociation Using a High-Performance MALDI-TOF/TOF Tandem Mass Spectrometer. *Analytical Chemistry* **2000**, *72*, 552-558.
- (80) Senko, M. W.; Hendrickson, C. L.; Emmett, M. R.; Shi, S. D. H.; Marshall, A. G. External accumulation of ions for enhanced electrospray ionization Fourier transform ion cyclotron resonance mass spectrometry *Journal of the American Society for Mass Spectrometry* **1997**, *8*, 970-976.
- (81) Nicolardi, S.; Palmblad, M.; Hensbergen, P.; Tollenaar, R.; Deelder, A.; van der Burgt, Y. Precision profiling and identification of human serum peptides using Fourier transform ion cyclotron resonance mass spectrometry. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* **2011**, *25*, 3457-3463.
- (82) Martin, S. A.; Karnovsky, M. L.; Krueger, J. M.; Pappenheimer, J. R.; and Bieman, K. Peptidoglycans as promoters of slow-wave sleep. I. Structure of the sleep-promoting factor isolated from human urine. *The Journal of Biological Chemistry* **1984**, *259*, 12652-12658.
- (83) Karas, M.; Glückmann, M.; Schäfer, J. Ionization in matrix-assisted laser desorption/ionization: singly charged molecular ions are the lucky survivors. *Journal of Mass Spectrometry* **2000**, *35*, 1-12.
- (84) Wilm, M. Principles of Electrospray Ionization. *Molecular & Cellular Proteomics* **2011**, *10*, M111.009407.
- (85) Wilm, M.; Mann, M. Analytical Properties of the Nanoelectrospray Ion Source. *Analytical Chemistry* **1996**, *68*, 1-8.
- (86) Lis, H.; Sharon, N. Lectins as molecules and as tools. *Annual Review of Biochemistry* **1986**, *55*, 35-67.
- (87) Yang, Z.; Hancock, W. Approach to the comprehensive analysis of glycoproteins isolated from human serum using a multi-lectin affinity column. *Journal of Chromatography A* **2004**, *1053*, 79-88.
- (88) Hahn, M.; Mendgen, K. Isolation by ConA binding of haustoria from different rust fungi and comparison of their surface qualities. *Protoplasma* **1992**, *170*, 95-103.
- (89) Nagi, A. M.; Babiuk, L. A. Peanut agglutinin (PNA): Binding and stimulation of bovine intestinal and peripheral blood leukocytes. *Veterinary Immunology and Immunopathology* **1989**, *22*, 67-78.

- (90) Tateno, H.; Nakamura-Tsuruta, S.; Hirabayashi, J. Comparative analysis of core-fucose-binding lectins from *Lens culinaris* and *Pisum sativum* using frontal affinity chromatography. *Glycobiology* **2009**, *19*, 527-536.
- (91) Debray, H.; Decout, D.; Strecker, G.; Spik, G.; Montreuil, J. Specificity of twelve lectins towards oligosaccharides and glycopeptides related to N-glycosylproteins. *European Journal of Biochemistry* **1981**, *117*, 41-55.
- (92) Omaetxebarria, M. J.; Hägglund, P.; Elortza, F.; Hooper, N. M.; Arizmendi, J. M.; Jensen, O. N. Isolation and characterization of glycosylphosphatidylinositol-anchored peptides by hydrophilic interaction chromatography and MALDI tandem mass spectrometry. *Analytical Chemistry* **2006**, *78*, 3335-3341.
- (93) Hägglund, P.; Bunkenborg, J.; Elortza, F.; Jensen, O. N.; Roepstorff, P. A new strategy for identification of N-glycosylated proteins and unambiguous assignment of their glycosylation sites using HILIC enrichment and partial deglycosylation. *Journal of Proteome Research* **2004**, *3*, 556-566.
- (94) German Cancer Research Center Heidelberg. GlycomeDB. www.glycome-db.org/ (accessed 08/20, 2012).
- (95) Joenväärä, S.; Ritamo, I.; Peltoniemi, H.; Renkonen, R. N-glycoproteomics - an automated workflow approach. *Glycobiology* **2008**, *18*, 339-349.

8. LIITTEET

Liite 1. LC-parametrit.

ACE Experimental Record	%A Data Channel: No
	%B Data Channel: Yes
----- Run method parameters -----	Primary A Pressure Data Channel: No
	Accumulator A Pressure Data Channel: No
-- PUMP --	Primary B Pressure Data Channel: No
	Accumulator B Pressure Data Channel: No
Waters GI Pump	Degasser Pressure Data Channel: No
1 -----	3 -----
Application Mode: Single Pump Trapping	Run Time: 92.00 min
Pump Type: BSM1	Pump A...
Run Time: 92.00 min	Aux Pump Role: Auxiliary
Solvent Selection A: A1	Aux Solvent Name: Water
Solvent Selection B: B1	Aux Flow Rate: 0.000 uL/min
Seal Wash: 90.0 min	Aux Solvent Selection: A1
Switch 1: No Change	Aux Low Pressure Limit: 0 psi
Switch 2: No Change	Aux High Pressure Limit: 10000 psi
Switch 3: No Change	Pump B...
Chart Out 1: System Pressure	Aux Pump Role: Lock Mass
Chart Out 2: %B	Aux Solvent Name: Water
Run Events: Yes	Aux Flow Rate: 0.200 uL/min
[Gradient Table]	Aux Solvent Selection: B1
Time(min) Flow Rate(uL/min) %A %B Curve	Aux Low Pressure Limit: 0 psi
1. Initial 0.300 97.0 3.0	Aux High Pressure Limit: 10000 psi
2. 60.00 0.300 60.0 40.0 6	
3. 65.00 0.300 15.0 85.0 6	-- END PUMP --
4. 70.00 0.300 15.0 85.0 6	
5. 72.00 0.300 97.0 3.0 6	-- AUTOSAMPLER --
6. 92.00 0.300 97.0 3.0 6	
Analytical Low Pressure Limit: 0 psi	Waters Acquity AutoSampler
Analytical High Pressure Limit: 10000 psi	Run Time: 92.00 min
Sample Loading Time: 6.00 min	Comment:
Trapping Flow Rate: 5.000 uL/min	Loop Option: Partial Loop
Trapping %A: 99.9	LoopOffline: Disable
Trapping %B: 0.1	Weak Wash Solvent Name: Water
Trapping Low Pressure Limit: 0 psi	Weak Wash Volume: 600 uL
Trapping High Pressure Limit: 7000 psi	Strong Wash Solvent Name: Acetonitrile
Flow Rate A Data Channel: No	Strong Wash Volume: 200 uL
Flow Rate B Data Channel: No	Target Column Temperature: 60.0 C
Solvent Name A: Water	Column Temperature Alarm Band: Disabled
Solvent Name B: Acetonitrile	Target Sample Temperature: 10.0 C
Comment:	Sample Temperature Alarm Band: Disabled

System Pressure Data Channel: Yes	Full Loop Overfill Factor: Automatic
Flow Rate Data Channel: No	Syringe Draw Rate: Automatic
Needle Placement: 0.1	----- Waters GI Pump Postrun Report -----
Pre-Aspirate Air Gap: Automatic	
Post-Aspirate Air Gap: Automatic	----- Waters Acquity SM Postrun Report -----
Column Temperature Data Channel: Yes	
Ambient Temperature Data Channel: Yes	Software Version: 1.41.1164
Sample Temperature Data Channel: No	Firmware Version: 1.41.215 (Feb 16 2009)
Sample Pressure Data Channel: No	Checksum: 0xb9e98c4c
Switch 1: No Change	Serial Number: L09NPS639M
Switch 2: No Change	Sample Syringe Size: 100.0
Switch 3: No Change	Sample Loop Size: 10.0
Switch 4: No Change	NeedleType: PEEK
Chart Out: Sample Pressure	Minimum Sample Temperature: 10.0
Sample Temp Alarm: Disabled	Maximum Sample Temperature: 10.0
Column Temp Alarm: Disabled	Average Sample Temperature: 10.0
Run Events: Yes	Minimum Column Temperature: 59.9
SampleLoop: 5.000	Maximum Column Temperature: 60.1
	Average Column Temperature: 60.0
	Measured Loop Volume: 11.700
Sample Run Injection Parameter	Measured Loop Volume No Pressure: 11.790
Injection Volume (ul) - 5.00	
-- END AUTOSAMPLER --	
End of experimental record.	

Liite 2. MS-parametrit.

Lock Spray Configuration:	
Reference Scan Frequency(sec)	10
Reference Cone Voltage(V)	40
Reference Capillary Voltage(kV)	0
Reference Trap Collision Energy	10
Temperature Correction:	
Temperature Correction	Disabled
Instrument Configuration:	
Lteff	1800
Veff	7223.83

Resolution	10000
Min Points in Peak	2
Acquisition Device	WatersADC
ADC Trigger Threshold (V)	1.5
ADC Input Offset (V)	-1.58
Average Single Ion Intensity	17
ADC Amplitude Threshold	4
ADC Centroid Threshold	-1
ADC Ion Area Threshold	1
ADC Ion Area Offset	10
ADC Pushes Per IMS Increment	1
EDC Delay Coefficient	1.58
EDC Delay Offset	-2.2
Tof Emulation Transfer Pulse Height (V)	0.1
Experimental Instrument Parameters	
Instrument Parameter Filename	E:\Projects.PRO\ACQUDB\120109_Picotip_TapperTip_01.ipr (MODIFIED)
Polarity	ES+
Analyser	Sensitivity Mode
Capillary (kV)	2.4
Source Temperature (°C)	105
Sampling Cone	45
Extraction Cone	4
Source Gas Flow (mL/min)	0
Desolvation Temperature (°C)	250
Cone Gas Flow (L/Hr)	30
Nanoflow Gas Pressure (Bar)	0.3
Purge Gas Flow (mL/h)	800
Desolvation Gas Flow (L/Hr)	800
LM Resolution	4.7
HM Resolution	15
Aperture 1	0
Pre-filter	2
Ion Energy	1
Manual Trap Collision Energy	FALSE
Trap Collision Energy	4
Manual Transfer Collision Energy	FALSE
Transfer Collision Energy	2
Manual Gas Control	FALSE
Trap Gas Flow (mL/min)	2
HeliumCellGasFlow	180
IMS Gas Flow (mL/min)	90
Detector	2950
DetectorCache	2300

Sample Infusion Flow Rate (μL/min)	0
Sample Flow State	Waste
Sample Fill Volume (μL)	250
Sample Reservoir	B
LockSpray Infusion Flow Rate (μL/min)	1
LockSpray Flow State	Infusion
LockSpray Reservoir	A
LockSpray Capillary (kV)	3.5
Use Manual LockSpray Collision Energy	FALSE
Collision Energy	4
Acceleration1	70
Acceleration2	200
Aperture2	40
Transport1	70
Transport2	70
Steering	0.5
Tube Lens	45
Pusher	1900
Pusher Offset	-0.53
Puller	1370
Collector	50
Collector Pulse	10
Stopper	10
Stopper Pulse	20
Entrance	62
Static Offset	120
Puller Offset	0
Reflectron Grid (kV)	1.474
Flight Tube (kV)	10
Reflectron (kV)	3.78
Use Manual Trap DC	FALSE
Trap DC Entrance	0
Trap DC Bias	2
Trap DC	-2
Trap DC Exit	2
Use Manual IMS DC	TRUE
IMS DC Entrance	-20
Helium Cell DC	1
Helium Exit	-20
IMSBias	2
IMS DC Exit	20
Use Manual Transfer DC	FALSE
Transfer DC Entrance	5
Transfer DC Exit	15

Source Manual Control	OFF
Source Wave Velocity (m/s)	300
Source Wave Height (V)	1.5
Trap Manual Control	OFF
Trap Wave Velocity (m/s)	300
Trap Wave Height (V)	0.5
IMS Manual Control	OFF
IMS Wave Velocity (m/s)	300
IMS Wave Height (V)	0
Transfer Manual Control	OFF
Transfer Wave Velocity (m/s)	247
Transfer Wave Height (V)	1
Target Enhancement Enabled	FALSE
Target Enhancement Mode	EDC
Target Enhancement Mass	556
Target Enhancement Trap Height (V)	4
Target Enhancement Extract Height (V)	15
Mobility Trapping Manual Release Enabled	FALSE
Mobility Trapping Release Time (μs)	200
Mobility Trap Height (V)	15
Mobility Extract Height (V)	0
Trag Gate LUT table enabled	FALSE
TriWave Trap Gate LookUp Table	
Using Drift Time Trimming	FALSE
Drift Time Bins	0
Using Mobility Delay after Trap Release	TRUE
IMS Wave Delay (μs)	450
Variable Wave Height Enabled	FALSE
Wave Height Ramp Type	Linear
Wave Height Start (V)	8
Wave Height End (V)	20
Wave Height Using Full IMS	TRUE
Wave Height Ramp (%)	100
Wave Height Look Up Table	
Variable Wave Velocity Enabled	FALSE
Wave Velocity Ramp Type	Linear
Wave Velocity Start (m/s)	
Wave Velocity End (m/s)	600
Wave Velocity Using Full IMS	TRUE
Wave Velocity Ramp (%)	100
Wave Velocity Look Up Table	
Backing	1.98E+00
Source	2.06E-03
Sample Plate	1.22E+03

Trap	6.85E-03
Helium Cell	1.58E-04
IMS	9.78E-05
Transfer	6.81E-03
TOF	8.06E-07
SourceRFOffset	450
IMSRFOffset	250
IMSMobilityRFOffset	250
TrapRFOffset	350
TransferRFOffset	380
MS Profile Type	Profile
MSProfileMass1	400
MSProfileDwellTime1	25
MSProfileRampTime1	5
MSProfileMass2	600
MSProfileDwellTime2	25
MSProfileRampTime2	45
MSProfileMass3	900
LockMassValidSigma	5
Acquisition mass range	
Start mass	800
End mass	2200
Calibration mass range	
Start mass	0
End mass	0
Experiment Reference Compound Name: N/A	
Function Parameters - Function 1 - TOF SURVEY FUNCTION	
[ACQUISITION]	
Survey Start Time	0
Survey End Time	90
[MS SURVEY]	
Survey Start Mass	800
Survey End Mass	2200
Discard uninteresting scans	NO
Switch to MS/MS when	Intensity rising above threshold
Intensity Threshold	150
Survey Scan Time	1
Survey Interscan Time	0.024
Survey Data Format	Continuum
ADC Sample Frequency (GHz)	3
[MS/MS]	

MSMS Start Mass	100
MSMS End Mass	3000
Number of components	2
MSMS to MS Switch Criteria	TIC falling below threshold
Switchback threshold (intensity / second)	100
Use MSMS to MS Switch After Time	YES
MSMS Switch After Time (sec)	20
Use MSMS to MS Switch After 1 Scan	NO
Use MSMS to MS Switch After N Scans	NO
MSMS Scan Time (sec)	1
MSMS Interscan Time (sec)	0.024
MSMS Data Format	Continuum
Use MS/MS ipr File	NO
[PEAK DETECTION]	
Use Include By Charge State	YES
Peak Detection Window	3
Charge State(s)	3,4
Number Of Include Components	60
Charge State Tolerance Window	3
Charge State Extraction Window	2
Deisotope Peak Selection	NO
[COLLISION ENERGY]	
Using MS Auto Trap Collision Energy (eV)	4
Using MS Auto Transfer Collision Energy (eV)	2
[CONE VOLTAGE]	
Survey Cone Voltage (V)	25
MSMS Cone Voltage (V)	25
[INCLUDE]	
Precursor Selection	Everything
[EXCLUDE]	
Detected Precursor Inclusion	Using Real Time Exclusion
Detected Precursor Inclusion	Include After Time
Include After Time (s)	30
Use Exclude Masses List	NO
Use Exclude File Masses	YES
Exclude Mass Filename	C:\Ville\Sakke_2058_exclude.txt
Exclude Retention Time Window	10
Exclude Window +/- (mDa)	1800
FragmentationMode	CID
Calibration	Dynamic 1
Function Parameters - Function 2 - TOF SURVEY FUNCTION	
Scan Time (sec)	1
Interscan Time (sec)	0.024

Set Mass	1366.2
Start Mass	100
MSMS End Mass	3000
Start Time (mins)	0
End Time (mins)	90
Data Format	Continuum
ADC Sample Frequency (GHz)	3
Use Tune Page Cone Voltage	NO
Cone Voltage (V)	25
Use Auto Trap Collision Energy	NO
Using Trap Collision Energy Profile	YES
CE Profile Filename	C:\Ville\Sakke_Glyco_CE_profile_04.txt
Using Auto Transfer Collision Energy (eV)	2
Sensitivity	Normal
Dynamic Range	Normal
Save Collapsed Retention Time Data	No
Use Rule File Filtering	No
FragmentationMode	CID
Calibration	Dynamic 2
Function Parameters - Function 3 - TOF SURVEY FUNCTION	
Scan Time (sec)	1
Interscan Time (sec)	0.024
Set Mass	805.4
Start Mass	100
MSMS End Mass	3000
Start Time (mins)	0
End Time (mins)	90
Data Format	Continuum
ADC Sample Frequency (GHz)	3
Use Tune Page Cone Voltage	NO
Cone Voltage (V)	25
Use Auto Trap Collision Energy	NO
Using Trap Collision Energy Profile	YES
CE Profile Filename	C:\Ville\Sakke_Glyco_CE_profile_04.txt
Using Auto Transfer Collision Energy (eV)	2
Sensitivity	Normal
Dynamic Range	Normal
Save Collapsed Retention Time Data	No
Use Rule File Filtering	No
FragmentationMode	CID
Calibration	Dynamic 2